

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CAMILA APARECIDA DE MENEZES

Co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores anaeróbios de leito fluidificado

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2022



CAMILA APARECIDA DE MENEZES

Co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores anaeróbios de leito fluidificado

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

D541c de Menezes, Camila Aparecida  
Co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores  
anaeróbios de leito fluidificado / Camila Aparecida de  
Menezes; orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2022.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de  
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,  
2022.

1. Dois estágios. 2. Hidrogênio. 3.  
1,3-Propanodiol. 4. Biorrefinaria. 5. Metagenômica. I.  
Titulo.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **CAMILA APARECIDA DE MENEZES.**

Título da tese: "Co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores anaeróbios de leito fluidificado".

Data da defesa: 06/12/2022.

### Comissão Julgadora

### Resultado

Prof. Dr. **Edson Luiz Silva**  
**(Orientador)**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovada.

Profa. Dra. **Roberta Albanex**

(Instituto Mauá de Tecnologia/Mauá)

Aprovada

Dr. **Lucas Tadeu Fuess**

(Pós-Doutorando/EP-USP)

Aprovada.

Prof. Dr. **Ariovaldo José da Silva**

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



*À minha avó Maria Ely (in memoriam).*

Dedico a ti tudo que fui, tudo que serei e tudo que sou.

Tu tens meu maior amor e minha eterna gratidão.





## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Edson Luiz Silva por sempre ter se preocupado com minha formação. Por ter me possibilitado crescer e evoluir como profissional. Obrigada pela orientação, os conselhos, e mais ainda, o exemplo.

À Escola de Engenharia de São Carlos (USP) e ao Departamento de Engenharia Química (UFSCar) pelo suporte ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Às Dras. Valéria Del Nery e Adriana Maluf Braga pelas considerações valiosas no Exame de Qualificação.

À Capes pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Às queridas Sá e Priscila por sempre terem me recebido tão bem na secretaria.

À usina Ipiranga, por meio do Sr. Wagner, à usina São Martinho, por meio do Sr. Betinho, à usina Iracema por meio do Sr. Nelson, e à usina da Pedra por meio da Dra. Valéria Del Nery. Obrigada a todos por fornecer a vinhaça de cana-de-açúcar utilizada no decorrer dos experimentos. Mais ainda, obrigada por sempre me receberem tão bem em cada coleta.

Aos funcionários do setor de transportes: Patrícia, Marcelo, Sr. Gil, Sr. Geraldo e Sr. Gerson. Patrícia e Marcelo, agradeço a paciência e prontidão. Srs. Gil, Geraldo e Gerson, obrigada por me acompanhar nas coletas, pelas conversas e bons momentos.

Aos docentes Profa. Dra. Márcia Damianovic, Profa. Dr. Maria do Carmo Calijuri e Prof. Dr. Juliano Corbi, Prof. Dr. Davi Gasparini, Prof. Dr. Valdir Schalch, Prof. Dr. Eduardo Cleto Pires, Prof. Dr. Eduardo Mário Mendiondo e Prof. Dr. Eugênio Foresti, da Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento (USP) pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas cursadas.

Aos técnicos do DEQ/UFSCar (Oscar da Silva, Samuel, Luan, Amadeu, Gabriel Fontes Pereira e Alexandra Gonçalves) e do LPB/USP (Maria Ângela Adorno) pela imprescindibilidade na execução deste trabalho. Agradeço também as auxiliares de limpeza do DEQ/UFSCar pelo cuidado com o Laboratório de Controle Ambiental II.

Ao Tiago Paladino pela paciência, parceria e ajuda no processamento dos dados de análise metagenômica. Por isso também agradeço ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (Unicamp).

Aos colegas de jornada no LCAII/DEQ/UFSCar (Aline Paranhos, Helbert Lopes, Tiago Ferreira, Gabriel Rego, Andreza Simões, Talles Barcelos, Lucas Ramos, Andressa Bernal,

Isabele Baima, Schayanna Macário, Priscilla Almeida, Lívia Massula, Andreza Borba, Alexandre Ribeiro, Carolina Machado, Kauanna Devens, Mariana Miziara e Yasmin Oliveira). Às meninas Carolina (Dolores), Kauanna, Mariana (Clotilde) e Yasmin (Samara) agradeço aos bons momentos e a todo aprendizado que me proporcionaram. Ao Talles e Andreza Simões, obrigada por me acolher tão bem na etapa de aprendizado do laboratório e por terem me ensinado tanto e com tanta paciência. À Schayanna obrigada pelo convívio diário e pelos momentos de descontração no doutorado. À Lívia pelas conversas esclarecedoras. À Priscilla pela parceria principalmente no ano de 2020 em que fomos uma pela outra (Pri, você com sua grande parceria foi essencial para finalização do meu trabalho). Ao Alexandre e Andreza obrigada pela companhia, pela paciência, por entenderem minha falta de paciência. Ao Lucas, obrigada por depositar sua confiança em mim, pela amizade, pelos ensinamentos diários e por deixar eu conhecer um pouco mais da pessoa que você é. À Isabele e Andressa por terem sido meu teto e meu chão no mestrado.

Às minhas amigas que se tornaram família em São Carlos (Andressa, Isabele, Allita, Naiza e Marina). Andressa, você é sensatez, cabeça na lua e é puro coração. Obrigada por ter me doado tanto de si sem pedir nada em troca. Obrigada por ter sido uma amizade forte, construída em momentos difíceis, que será levada para vida toda. Isabele, você é cabeça erguida, sorriso largo e pura maturidade. Você significa muito para mim. Você me ensinou a olhar a vida de um modo diferente, isso ninguém muda! Obrigada por me deixar fazer parte da sua vida e compartilhar momentos ímpares com você. Allita, obrigada pela convivência, por ter me ensinado tanto e por ter sido muitas vezes meu ombro e porto-seguro. Marina, a você sou extremamente grata por todos esses anos, por ter me dado sua amizade, um dos meus bens mais preciosos. Obrigada pela segurança de saber que sempre posso contar com você, assim como saiba que sempre poderá contar comigo.

Aos prezados William Alves, Cláudia Beatriz, Mazzaroppi, Jéssica Marcela, João Cláudio, Raquel Lisa, Murilo Ferreira e Murilo Senhuki. Obrigada por de alguma forma terem me auxiliado a chegar até aqui.

Aos professores Dra. Bruna Vieira, Dra. Bruna Coelho, Dra. Ana Paula, Dra. Patrícia Martins, Dr. Deusmaque Ferreira, Dr. Júlio César de Souza Inácio Gonçalves, Dr. Alex Utsumi, Dr. Vinícius Rocha, Dr. José Cláudio, Dr. Guilherme Lopes Júnior, pelos conhecimentos transmitidos na minha etapa de formação que foram imprescindíveis para eu ingressar na pós-graduação.

À Bruna Lopes Coelho pela amizade que começou em sala de aula e foi para a vida. Obrigada pelos conhecimentos, pelo exemplo (quando crescer quero ser como você) e pelos bons momentos.

Ao Magno José Alves. Não posso deixar de te agradecer no cumprimento dessa etapa da minha vida. Você foi a pessoa que insistiu para eu seguir a vida acadêmica. Agradeço por ter pagado minha inscrição no mestrado, mais ainda, por ter acreditado e mim e me feito acreditar que eu sou capaz.

À Alessandra Balduino por ter me ajudado a escolher minha primeira casa em São Carlos. Obrigada pelo apoio e por ter contribuído na minha mudança.

Ao João Batista da Silva (*in memoriam*). Tudo que eu gostaria é que você estivesse aqui para comemorar comigo. Obrigada por todo o incentivo durante toda a minha vida. Obrigada por ter entrado na minha vida e contribuído para que eu seja quem sou hoje.

Aos meus padrinhos e amigos: Dilma Helena, Varley, Dona Olísia, Sr. “Oripe” (*in memoriam*), D. Sebastiana (*in memoriam*) e Sr. Orlando. Obrigada a vocês por tamanha contribuição na minha formação pessoal!

À minha tia Cárita, meu tio José Lázaro (*in memoriam*) e minha prima Vanessa, obrigada por terem me incentivado tanto ao longo da minha vida. Quando fecho os olhos tenho somente lembranças boas dos momentos que passamos juntos. Tia Cárita e Vanessa, nunca me esquecerei do quanto me ajudaram na mudança para São Carlos. De cada vez que chegavam com um presente nas mãos pensando na minha futura casa sozinha. Obrigada também por terem acreditado na minha capacidade.

À minha amiga Antonieta pela parceria de longa data. Obrigada por nunca me “abandonar”.

Aos meus amigos (Célia, Wilton, Williane, Cecília, Weudes, Weverton, Maísa, Deuziane, Mirlene e Sales). Obrigada por todo o carinho, alegria e acolhia. Com toda certeza vocês melhoraram minha vida. Cecília, a madrinha ama você.

À Ana Luísa Curado, uma amizade que começou em uma sala de espera e que durará para toda vida. Você é minha irmã de alma. Obrigada pelo seu exemplo, sua parceria, seu ombro amigo e seus conselhos. Ao Sérgio Júnior por toda essa amizade e por cuidar tão bem da minha Bigula. À Lavínia, que nem chegou ainda e já melhorou a vida da titia.

Aos meus familiares (Adir Júnior, Flávia, Keila, Tayná, Amanda, Carlos Eduardo, Letícia Pabla, Ildeu Camilo e Pierre). Obrigada “tio Dedé” por ter contribuído diretamente na minha formação, por seu apoio incondicional e por ter sido meu irmão. Não tenho palavras para agradecer ou dizer o quanto você é importante para mim! Obrigada Flávia (Nega Preta) por ter

sido minha amiga e parceira a vida toda. Nossos momentos de cumplicidade sempre vão ficar marcados. Obrigada tio Dedé e Flávia por me confiar ser madrinha da Amanda e da Tayná, elas são minha alegria e minha esperança de um futuro melhor. Obrigada ao meu irmão Carlos Eduardo pela parceria da vida toda. Letícia, sou muito grata a ti por me tratar tão bem, por fazer das minhas idas à Uberaba uma festa e por cuidar tanto do meu pai. Obrigada Ildeu Camilo, meu vô e amigo, o senhor é prova que nunca é tarde para conhecer alguém e estabelecer uma amizade. Pierre, obrigada por sempre me receber tão bem e ser tão parceiro.

Aos meus pais Lucimeire Almeida e Ildeu Menezes. Mãe, olhando para o passado vejo todas as escolhas que você fez para o meu bem. Obrigada por toda sua criação que me transformaram no ser humano e na profissional que sou hoje. Se não fosse por você, não teria chegado até aqui! Pai, obrigada por tudo o que fez por mim na minha vinda para São Carlos e tudo que faz por mim quando volto para visitar Uberaba.

Ao Willame Cavalcante que me deu total suporte para fazer o doutorado. Obrigada por tanto apoio, amor e paciência. Obrigada por ter me ensinado tanto com sua história de vida. Obrigada por ter dividido sua vida comigo. Você me fez acreditar que sou capaz, mesmo quando eu não acreditava. Você cuidou de mim, mesmo sem ter obrigação.

À minha vó/mãe Maria Ely (*in memoriam*), que me criou para trilhar o caminho do bem, que me deu amor, que me deu lar, que me deu colo e tudo mais que um ser humano possa dar. Se estou escrevendo este texto hoje é por você. Espero que de onde você estiver, você saiba que és minha maior saudade, meu maior amor e meu maior exemplo.

À menininha de 7 anos que carregava a mochila pesada nas costas e andava km e km sozinha para estudar. À menina que aos 15 trabalhava e estudava de 06 h às 23 h. À adolescente que contra conselhos controversos não “guardou o dinheiro do vestibular”. À mulher que pegou gosto e começou a acreditar que era capaz. Menininha, menina, adolescente e mulher, vocês não são inteiramente o que sou hoje, mas vocês me trouxeram até aqui e fazem parte de mim em cada vitória e cada cicatriz. Sou extremamente grata por toda a força de vontade que vocês tiveram.

À Deus por todas as pessoas que passaram na minha vida, por uma vida plena, por ter saúde, teto e serenidade. Com toda certeza tenho mais do que mereço!

Por fim, agradeço a todos que fizeram/fazem parte da minha vida e estão contribuindo de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional.

*Meus agradecimentos.*

*“Libertas Quæ Sera Tamen”* 



## RESUMO

MENEZES, C.A. **Co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores anaeróbios de leite fluidificado**. 2022. 325p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A fermentação e digestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerina como cossustratos é uma alternativa para balanceamento nutricional, diluição de inibidores, aumento da biodegradabilidade e extração de produtos de valor agregado a partir de dois substratos amplamente produzidos no Brasil, tudo em um mesmo aparato experimental. Este estudo objetivou avaliar o efeito do aumento das concentrações de vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO) de 10 para 20 g DQO L<sup>-1</sup> em reator anaeróbio de leite fluidificado (RALF) acidogênico termofílico (55 °C) (60 - 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e de 2 para 20 g DQO L<sup>-1</sup> em RALFs metanogênicos de dois estágios termofílico (55 °C) e mesofílico (25 °C) e um estágio termofílico (55 °C) (2 a 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). O RALF metanogênico de um estágio apresentou performance estável de produção de metano e remoção de matéria orgânica até 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e isso foi confirmado pela predominância de *Methanothrix* em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O maior rendimento de hidrogênio no RALF acidogênico (0,29 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) foi observado em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e foi associado ao alongamento de cadeia de HLa e acetato à butirato. Este resultado foi corroborado pela composição taxonômica do reator (*Lacticaseibacillus* e *Clostridium*) e detecção dos genes associados a essa via (*ldhA*, *LDH*, *ldh*). Apesar do efeito antagônico observado no reator acidogênico, a performance de produção de metano em dois estágios foi estável em RALF mesofílico e termofílico até 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Essa similaridade se refletiu na composição da biomassa dos reatores, que apresentaram balanceamento entre abundâncias relativas de arqueias acetoclásticas e hidrogenotróficas. A digestão mesofílica apresentou vantagem sobre a termofílica até 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> devido à eliminação de agente tamponante. Em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, o RALF mesofílico apresentou falha. Porém, no geral, a co-digestão de vinhaça e glicerina foi estável em um e dois estágios. Então, os ganhos da co-digestão de vinhaça em dois estágios em relação a um estágio só são evidentes para maximização da produção e futura extração de metabólitos no reator acidogênico e para casos de variações significativas da composição de vinhaça afluenta aos reatores.

Palavras-chave: Dois estágios. Hidrogênio. 1,3-Propanodiol. Biorrefinaria. Metagenômica.





## ABSTRACT

MENEZES, C.A. **Anaerobic co-digestion of vinasse and glycerin in anaerobic fluidized bed reactors**. 2022. 325p. Thesis - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

The fermentation and anaerobic digestion of sugarcane vinasse and glycerin as co-substrates is an alternative for nutritional balance, dilution of inhibitors, increased biodegradability, and treatment of wastewater widely produced in Brazil in the same experimental apparatus. The present study aimed to evaluate the effects of increasing the concentrations of vinasse and glycerin (50%: 50% on a COD basis) from 10 to 20 g COD L<sup>-1</sup> in an acidogenic and thermophilic anaerobic fluidized bed reactor (ALF) (55 °C) (60 – 120 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>), from 2 to 20 g COD L<sup>-1</sup> in thermophilic (55 °C) and mesophilic (25 °C) two-stage methanogenic RALFs, and from 2 to 20 g COD L<sup>-1</sup> in a one-stage thermophilic RALF (55°C) (2 to 20 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) were evaluated. The one-stage methanogenic RALF showed stable performance of methane production and organic matter removal up to 20 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, and this was confirmed by the predominance of *Methanothrix* at 10 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. The highest yield of hydrogen in acidogenic RALF (0.29 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> COD<sub>applied</sub>) was observed in 120 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> and was associated with chain elongation of lactate and acetate to butyrate. This result was supported by the taxonomic composition of the reactor (*Lacticaseibacillus* and *Clostridium*) and the detection of genes associated with this pathway (*ldhA*, *LDH*, *ldh*). Despite the antagonistic effect observed in the acidogenic reactor, the methane production performance in two stages was stable in mesophilic and thermophilic RALF up to 15 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. This behavior was reflected in the biomass composition of the reactors, which showed a similar balance between relative abundances of acetoclastic and hydrogenotrophic archaea. Mesophilic digestion showed an advantage over thermophilic digestion up to 10 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> due to the elimination of buffering. At 20 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, the mesophilic RALF failed. However, in general, vinasse and glycerin co-digestion were stable in one or two stages. Therefore, the gains of co-digestion of vinasse in two stages compared to one stage are only evident for maximizing production and future extraction of metabolites in the acidogenic reactor and for cases of significant variations in the composition of vinasse influent to the reactors.

Keywords: Two-stage. Hydrogen. 1,3-Propanediol. Biorefinery. Metagenomics.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa da localização aproximada das usinas de produção de biodiesel (A) e etanol (B) no estado de São Paulo (Fonte: adaptado da ANP, 2019).....	32
Figura 2. Sequência das etapas de produção de açúcar e etanol em uma usina anexa.....	37
Figura 3. Possíveis rotas da fermentação primária de glicose ao inferir que a vinhaça é um substrato rico em carboidratos (Entre colchetes estão os números de comissão de enzima para os principais KO).....	42
Figura 4. Número de artigos publicados de 2010 - 2020 que contém os “co-digestion” (co-digestão) e “co-fermentation” (co-fermentação) nas palavras-chave, título ou resumo.....	67
Figura 5. Produções anuais de biodiesel e glicerina de 2010-2020.....	69
Figura 6. Possíveis rotas da fermentação primária de glicerol.....	71
Figura 7. Aparato experimental utilizado nos experimentos, composto por: a) reator anaeróbio de leiteo fluidificado; b) <i>head-space</i> ; c) tanque de alimentação; d) saída de efluente líquido; e) coleta e mensuração do volume de efluente; f) saída de efluente gasoso; g) medição de biogás; h) bomba de recirculação; i) banho termostatizado; j) foto do aparato experimental.....	124
Figura 8. Fluxograma geral das condições operacionais aplicadas aos RALFs.....	125
Figura 9. Representação e corte de RALF contendo material suporte: a) pneu triturado utilizado nos RALFs metanogênicos; e b) argila expandida utilizada no RALF acidogênico.....	126
Figura 10. Condições operacionais aplicadas ao RALF-MT.....	129
Figura 11. Sequência dos procedimentos de inoculação do RALF.....	131
Figura 12. Condições operacionais aplicadas ao RALF-AT.....	134
Figura 13. Condições operacionais aplicadas aos RALF-ST e RALF-SM.....	135
Figura 14. Efeito do aumento lento e escalonado da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-MT.....	145
Figura 15. Efeito do aumento lento e escalonado da TCO no MY do RALF-MT.....	147
Figura 16. Média dos valores diários de remoção de DQO do RALF-MT após inoculação 2 ( $\Delta$ ) comparada à média do RALF-MT após inoculação 1 (-·-·-·-·).....	149
Figura 17. Média dos valores diários de SSV do RALF-MT após inoculação 2 ( $\Delta$ ) comparada à média do RALF-MT após inoculação 1 (-·-·-·-·).....	150
Figura 18. Média dos valores diários de MY do RALF-MT após inoculação 2 ( $\Delta$ ) comparada à média do RALF-MT após inoculação 1 (-·-·-·-·).....	151
Figura 19. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-MT.....	154

Figura 20. Concentração de sulfato removida em função da TCO aplicada ao RALF-MT ..	158
Figura 21. Efeito do aumento da TCO na PVM <sub>leito</sub> do RALF-MT .....	160
Figura 22. Efeito do aumento da TCO no MY do RALF-MT .....	160
Figura 23. Perfil taxonômico em nível de domínio da biomassa extraída do meio suporte do RALF-MT em 10,0 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C. As sequências de DNA foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya .....	164
Figura 24. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-MT em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C .....	165
Figura 25. Mapa de calor contendo valores relativos dos Filos; Gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-MT em 10,0 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C .....	168
Figura 26. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de glicerol no RALF-MT .....	170
Figura 27. Atribuição de taxonomia aos KO do metabolismo de butanoato na amostra do RALF-MT .....	180
Figura 28. Atribuição de taxonomia aos KO do metabolismo de propanoato a partir da degradação de succinato na amostra do RALF-MT .....	181
Figura 29. Atribuição de taxonomia aos KO do metabolismo de metano na amostra do RALF-MT .....	184
Figura 30. Possíveis vias para a digestão de glicerol, carboidratos e lactato no RALF-MT. Os números entre chaves representam os EC (Números da Comissão de Enzimas) para os principais KO identificados e os valores em parêntesis são as abundâncias relativas dos principais gêneros identificados na amostra de 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> .....	185
Figura 31. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-AT .....	188
Figura 32. Efeito do aumento da TCO no %H <sub>2</sub> no biogás do RALF-AT .....	192
Figura 33. Efeito do aumento da TCO na PVH do RALF-AT .....	193
Figura 34. Efeito do aumento da TCO no HY do RALF-AT .....	193
Figura 35. Efeito do aumento da TCO na produção de metabólitos líquidos no RALF-AT .	196
Figura 36. Perfil taxonômico em nível de domínio da biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em 120 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> . As sequências de DNA foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya .....	202
Figura 37. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em 120 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C .....	203

Figura 38. Mapa de calor contendo valores relativos dos Filos; Gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em 120 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C.....	206
Figura 39. Abundância relativa dos 15 principais gêneros do domínio Bacteria identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em 120 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C.....	207
Figura 40. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de glicerol no RALF-AT .....	215
Figura 41. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na síntese de L e D-Lactato (metabolismo do piruvato) no RALF-AT.....	216
Figura 42. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na síntese de propanoato na metabolização de lactato no RALF-AT.....	217
Figura 43. Possíveis vias para a fermentação de glicerol, carboidratos e lactato no RALF-AT. Os números entre chaves representam os EC (Números da Comissão de Enzimas) para os principais KO identificados e os valores em parêntesis são as abundâncias relativas dos principais gêneros identificados na amostra de 120 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> .....	220
Figura 44. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-ST .....	223
Figura 45. Efeito do aumento da TCO na PVM do RALF-ST.....	229
Figura 46. Efeito do aumento da TCO no MY do RALF-ST.....	230
Figura 47. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-SM.....	232
Figura 48. Efeito do aumento da TCO na PVM do RALF-SM.....	239
Figura 49. Efeito do aumento da TCO no MY do RALF-SM.....	239
Figura 50. Perfil taxonômico em nível de domínio da biomassa extraída do meio suporte dos a) RALF-ST e b) RALF-SM em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> . .....	241
Figura 51. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-ST em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C .....	242
Figura 52. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-SM em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 25 °C .....	243
Figura 53. Abundância relativa dos 15 principais gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-ST em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 55 °C .....	244
Figura 54. Abundância relativa dos 15 principais gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-SM em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e 25 °C.....	245
Figura 55. Análise de coordenadas ponderadas principais dos gêneros nos RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM em 10 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> .....	249

Figura 56. Possíveis vias para a degradação de efluente do reator RALF-AT nos RALF-ST e RALF-SM em $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .	251
Figura 57. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na etapa de glicólise dos RALF-ST e RALF-SM	261
Figura 58. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de glicerol nos RALF-ST e RALF-SM.	262
Figura 59. Detalhamento das enzimas envolvidas na possível rota de degradação de 1,3-propanodiol nos RALF-ST e RALF-SM. Os números entre colchetes são os códigos das enzimas; <sup>1</sup> : principais gêneros associados ao gene da enzima no RALF-ST; <sup>2</sup> : principais gêneros associados ao gene da enzima no RALF-SM.	263
Figura 60. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de propionato nos RALF-ST e RALF-SM.	265
Figura 61. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados e associados a metanogênese nos RALF-ST e RALF-SM.	266
Figura 62. Ajuste linear do modelo <i>Stover–Kincannon</i> modificado aplicado aos dados em estado estacionário dos RALF-MT (a), RALF-ST (b) e RALF-SM (c)	268
Figura 63. Efeito do aumento da temperatura de operação nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-AT	272
Figura 64. Efeito do aumento da temperatura de operação na produção de metabólitos líquidos no RALF-AT	274
Figura 65. Remoções de carboidratos totais, glicerina e matéria orgânica nos RALF-ST (a) e RALF-SM (b) em função das temperaturas aplicadas aos RALF-AT e RALF-ST	276
Figura 66. MY dos RALF-ST (a) e RALF-SM (b) em função das temperaturas aplicadas aos RALF-AT e RALF-ST	277
Figura 67. Remoções de carboidratos totais, glicerina e matéria orgânica do RALF-MT em função das temperaturas aplicadas	278
Figura 68. MY do RALF-MT em função das temperaturas aplicadas.	279
Figura 69. Regressão linear dos dados de $\text{PVM}_{\text{leito}}$ em função da TCO aplicada ao RALF-MT em: (a) todas as condições operacionais (·····) e (b) negligenciando os dados em TCO de $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (- - -)	279

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reações e variação da energia livre da digestão anaeróbia de carboidratos em diferentes temperaturas.....	43
Tabela 2. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de vinhaça .....	50
Tabela 3. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Vinhaça em estágio único e em dois estágios .....	62
Tabela 4. Reações e variação da energia livre da digestão anaeróbia do glicerol em diferentes temperaturas.....	74
Tabela 5. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de Glicerol Residual e Glicerina.....	75
Tabela 6. Cossustratos utilizados na produção de 1,3-PDO a partir do glicerol .....	97
Tabela 7. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Glicerol em estágio único e dois estágios .....	101
Tabela 8. Adição de glicerina à substratos diversos e acréscimo em produtividade de metano da co-digestão em relação à mono-digestão.....	112
Tabela 9. Caracterização dos lotes de vinhaça de cana-de-açúcar .....	128
Tabela 10. Condições operacionais aplicadas, tempo de operação e lote de vinhaça utilizado em cada etapa de operação da produção de metano em estágio único.....	130
Tabela 11. Meio nutricional utilizado na alimentação dos RALF-AT e RALF-MT.....	131
Tabela 12. Condições operacionais aplicadas, tempo de operação e lote de vinhaça utilizado em cada etapa de operação da produção de hidrogênio e metabólitos solúveis.....	134
Tabela 13. Condições operacionais aplicadas e tempo de operação de cada etapa da produção de metano em estágio duplo (sequencial) em RALFs termofílico e mesofílico.....	136
Tabela 14. Valores utilizados na conversão da concentração dos compostos para g DQO L <sup>-1</sup> .....	143
Tabela 15. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais, glicerina e DQO em função da TCO aplicada ao RALF-MT.....	153
Tabela 16. Valores médios de AGV e relação AI/AP nas amostras de efluente do RALF-MT em função da TCO aplicada .....	157
Tabela 17. Produção de metano no RALF-MT em função da TCO aplicada .....	159
Tabela 18. Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT .....	171

Tabela 19. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais e glicerina em função da TCO aplicada ao RALF-AT.....	187
Tabela 20. Valores médios da concentração de sólidos nas amostras de efluente do RALF-AT em função da TCO aplicada.....	191
Tabela 21. Produção de hidrogênio no RALF-AT em função da TCO aplicada.....	191
Tabela 22. Fermentação de vinhaça e glicerina como mono e cossustratos em RALFs termofílicos .....	194
Tabela 23. Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-AT.....	209
Tabela 24. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais, glicerina e DQO em função da TCO aplicada ao RALF-ST.....	222
Tabela 25. Valores médios de AGV e relação AI/AP nas amostras de efluente do RALF-ST .....	225
Tabela 26. Valores médios da concentração de sólidos nas amostras de efluente do RALF-ST .....	227
Tabela 27. Produção de metano no RALF-ST em função da TCO aplicada .....	228
Tabela 28. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais, glicerina e DQO em função da TCO aplicada ao RALF-SM .....	234
Tabela 29. Valores médios de AGV e relação AI/AP nas amostras de efluente do RALF-SM .....	236
Tabela 30. Valores médios da concentração de sólidos nas amostras de efluente do RALF-SM .....	237
Tabela 31. Produção de metano no RALF-SM em função da TCO aplicada.....	238
Tabela 32. Reações sintróficas de oxidação de ácidos e álcoois .....	247
Tabela 33. Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT).....	252
Tabela 34. Médias dos dados de remoção de matéria orgânica, PVM e MY em estado estacionário .....	270
Tabela 35. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais e glicerina em função da temperatura de operação aplicada ao RALF-AT .....	272
Tabela 36. Comparação entre os resultados de fermentações e digestões de vinhaça e glicerina como mono-substratos com os observados na co-digestão de 50% vinhaça: 50% glicerina em RALF .....	281



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABR	Reator anaeróbico compartimentado ( <i>Anaerobic baffled reactor</i> )
AGV	Ácidos graxos voláteis
AI/AP	Relação entre a alcalinidade intermediária e a alcalinidade parcial
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AnSBBR	Bateladas sequenciais ( <i>Anaerobic sequencing batch biofilm reactor</i> )
APBR	Reator anaeróbico de leito empacotado ( <i>Anaerobic packed-bed reactor</i> )
ASBR	Bateladas sequenciais ( <i>Anaerobic sequencing batch reactor</i> )
BuOH	Butanol
CH <sub>4</sub>	Metano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSTR	Reator tanque agitado contínuo ( <i>Continuous stirred-tank reactor</i> )
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
EC	Código da enzima ( <i>Enzyme code number</i> )
EGSB	Reator anaeróbico de leito granular expandido ( <i>Expanded granular slugde bed</i> )
EtOH	Etanol
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FVR	Reator de leito estruturado
GP	Glicerina pura
GR	Glicerol residual
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
%H <sub>2</sub>	Percentual de hidrogênio
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
HLa	Ácido lático
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPr	Ácido propiônico
HSu	Ácido succínico
HY	Rendimento de hidrogênio ( <i>Hydrogen Yield</i> )
KO	<i>KEGG Orthology</i>

MeOH	Metanol
MY	Rendimento de metano ( <i>Methane Yield</i> )
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
pH	potencial Hidrogeniônico
PVH	Produção volumétrica de hidrogênio
PVM	Produção volumétrica de metano
RALF	Reator anaeróbio de leito fluidificado
RALF-AT	Reator anaeróbio de leito fluidificado acidogênico
RALF-MT	Reator anaeróbio de leito fluidificado metanogênico
RALF-SM	Reator anaeróbio de leito fluidificado sequencial mesofílico
RALF-ST	Reator anaeróbio de leito fluidificado sequencial termofílico
SBR	Bateladas sequenciais ( <i>Sequencing batch reactor</i> )
SSF	Sólidos suspensos fixos
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TCO	Taxa de carregamento orgânico
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo ( <i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> )
UCB	Reator em coluna com fluxo ascendente ( <i>Upflow column bioreactor</i> )
V <sub>mf</sub>	Velocidade de mínima fluidificação
Y <sub>1,3-PDO</sub>	Rendimento de produção de 1,3-propanodiol
1,3-PDO	1,3-propanodiol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESES E OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1	HIPÓTESES SECUNDÁRIAS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>36</b>
3.1	VINHAÇA: DA GERAÇÃO AO REAPROVEITAMENTO .....	36
<b>3.1.1</b>	<b>Alternativas para redução de impactos: digestão anaeróbia.....</b>	<b>40</b>
3.1.1.1	<i>Digestão anaeróbia.....</i>	41
<b>3.1.2</b>	<b>Produção de metano a partir de vinhaça.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Produção de hidrogênio a partir de vinhaça .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Digestão anaeróbia de vinhaça em dois estágios .....</b>	<b>59</b>
3.1.4.1	<i>Sulfato .....</i>	61
3.2	CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	67
<b>3.2.1</b>	<b>Co-digestão de vinhaça .....</b>	<b>67</b>
3.3	A GLICERINA COMO CURINGA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	68
<b>3.3.1</b>	<b>Produção de biodiesel .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Glicerol residual .....</b>	<b>69</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Utilização do glicerol por microrganismos.....</b>	<b>70</b>
3.3.3.1	<i>Fermentação escura para produção de H<sub>2</sub>.....</i>	72
3.3.3.2	<i>Produção de H<sub>2</sub> utilizando glicerol como cossustrato .....</i>	89
<b>3.3.4</b>	<b>Fermentação escura para produção de 1,3-propanodiol.....</b>	<b>92</b>
3.3.4.1	<i>Produção de 1,3-PDO por meio da co-fermentação.....</i>	96
<b>3.3.5</b>	<b>Digestão anaeróbia da glicerina: enfoque na produção de CH<sub>4</sub>.....</b>	<b>99</b>
<b>3.3.6</b>	<b>A glicerina como cossustrato na digestão anaeróbia.....</b>	<b>110</b>
3.4	CONSIDERAÇÕES E JUSTIFICATIVAS.....	120
<b>3.4.1</b>	<b>Co-digestão de vinhaça e glicerina em RALF termofílico.....</b>	<b>121</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Co-digestão de vinhaça e glicerina em dois estágios .....</b>	<b>122</b>
3.4.2.1	<i>Co-fermentação de vinhaça e glicerina em RALF termofílico .....</i>	122
3.4.2.2	<i>RALFs metanogênicos termofílico e mesofílico de segundo estágio.....</i>	123
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>124</b>
4.1	REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFICADO .....	126
4.2	SUBSTRATOS .....	127

4.3	INÓCULOS.....	127
4.4	OPERAÇÃO DOS REATORES.....	129
<b>4.4.1</b>	<b>RALF-MT .....</b>	<b>129</b>
4.4.1.1	<i>Aumento lento e escalonado da concentração de cossustratos em modo contínuo</i>	<i>130</i>
4.4.1.2	<i>Aumento rápido da concentração de cossustratos em modo batelada .....</i>	<i>132</i>
4.4.1.3	<i>Efeito do aumento da temperatura na produção de metano .....</i>	<i>133</i>
<b>4.4.2</b>	<b>RALF-AT .....</b>	<b>133</b>
<b>4.4.3</b>	<b>RALF-ST e RALF-SM.....</b>	<b>134</b>
4.5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	137
4.6	ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	138
4.7	ANÁLISE CINÉTICA .....	139
4.8	CÁLCULOS DE INDICADORES DE DESEMPENHO .....	139
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>144</b>
5.1	DIGESTÃO ANAERÓBIA EM ESTÁGIO ÚNICO: RALF-MT.....	144
<b>5.1.1</b>	<b>Efeito do aumento da TCO no desempenho do RALF-MT.....</b>	<b>145</b>
5.1.1.1	<i>Aumento lento e escalonado da concentração de cossustratos em reator contínuo</i>	<i>145</i>
5.1.1.2	<i>Aumento rápido da concentração de cossustratos em modo batelada .....</i>	<i>148</i>
5.1.1.3	<i>Desempenho geral do RALF-MT .....</i>	<i>152</i>
<b>5.1.2</b>	<b>Composição microbiana no RALF-MT em 10,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C.....</b>	<b>163</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Distribuição das funções metabólicas no RALF-MT .....</b>	<b>169</b>
5.2	DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS: RALF-AT.....	186
<b>5.2.1</b>	<b>Efeito do aumento da TCO no desempenho fermentativo do RALF-AT .....</b>	<b>186</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Efeito do aumento da TCO na distribuição de metabólitos líquidos no RALF-AT</b>	<b>196</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Composição microbiana no RALF-AT em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C.....</b>	<b>201</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Distribuição das funções metabólicas no RALF-AT .....</b>	<b>208</b>
5.3	DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS: RALF-ST E RALF-SM.....	221
<b>5.3.1</b>	<b>Remoção de matéria orgânica e produção de metano no RALF-ST.....</b>	<b>221</b>
5.3.1.1	<i>Efeito do aumento da TCO no desempenho do RALF-ST.....</i>	<i>221</i>
<b>5.3.2</b>	<b>Remoção de matéria orgânica e produção de metano no RALF-SM.....</b>	<b>231</b>
5.3.2.1	<i>Efeito do aumento da TCO no desempenho do RALF-SM.....</i>	<i>232</i>
<b>5.3.3</b>	<b>Composição microbiana nos RALF-ST e RALF-SM em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> ..</b>	<b>240</b>

5.3.3.1	<i>Distribuição das funções metabólicas nos RALF-ST e RALF-SM.....</i>	249
<b>5.3.4</b>	<b>Comparação entre a digestão em um e dois estágios .....</b>	<b>267</b>
5.3.4.1	<i>Stover–Kincannon.....</i>	267
5.3.4.2	<i>Análise estatística .....</i>	269
5.4	EFEITO DA TEMPERATURA NA CO-DIGESTÃO DE VINHAÇA E GLICERINA 271	
<b>5.4.1</b>	<b>Efeito do aumento da temperatura no desempenho do RALF-AT .....</b>	<b>271</b>
5.4.1.1	<i>Efeito do aumento da temperatura na produção de metano em um e dois estágios</i>	275
5.5	PERFORMANCE GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	280
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>283</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>285</b>
	<b>ANEXO A- BALANÇO DE DQO DOS RALF .....</b>	<b>324</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de reduzir a dependência de combustíveis fósseis e a busca por fontes de energia renováveis levou ao aumento da produção de biocombustíveis no Brasil, como o etanol e o biodiesel. O Brasil é atualmente o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Estima-se que a produção de cana no país foi expandida em 28% entre a safra 2019/2020 e a safra 2012/2013 (ALBANEZ et al., 2016a; CONAB, 2022). Ainda, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, a safra 2020/2021 atingiu a geração de 29 bilhões de litros de etanol, dos quais, 48% foram produzidos no estado de São Paulo (CONAB, 2022). Por outro lado, um grande revés do grande volume de etanol produzido é a geração de vinhaça. Neste caso, considerando a proporção de doze litros de vinhaça para cada litro de etanol gerado, a última safra resultou em cerca de 395 bilhões de litros deste resíduo, a maioria dos quais lançados nas lavouras (fertirrigação) (SYDNEY et al., 2021).

Apesar da fertirrigação se mostrar vantajosa devido aos nutrientes e água presentes na vinhaça, esta prática é potencial causadora de impactos ao solo e aos corpos d'água devido à grande quantidade de vinhaça gerada. Adicionalmente, o lançamento de vinhaça no solo pode ser considerado desperdício do potencial energético deste resíduo. Por este motivo, a digestão anaeróbia tem sido amplamente apontada nas últimas décadas como tecnologia promissora para recuperação de energia e produtos de valor agregado a partir de vinhaça, ao passo que acarreta redução do seu conteúdo orgânico. Além de gerar produtos com elevado conteúdo energético, a vinhaça digerida mantém a capacidade fertilizante, podendo subsequentemente ser utilizada para a fertirrigação. Entretanto, para que essa tecnologia seja uma realidade em larga escala ainda se faz necessário aumento da estabilidade operacional.

A redução da estabilidade operacional da digestão de vinhaça pode ser atribuída tanto à composição deste substrato quanto ao fato de a cana-de-açúcar ser uma cultura sazonal. A vinhaça contém fenóis e melanoidinas e é sabido que essas substâncias são tóxicas aos microrganismos responsáveis pela digestão quando adicionadas em altas concentrações, o que prejudica a digestão de vinhaça em cargas elevadas. Além disso, o sulfato presente na vinhaça pode ocasionar competição entre os microrganismos redutores de sulfato e produtores de metano quanto deteriorar a qualidade do biogás. Neste caso, uma possibilidade para o aumento da concentração de carbono da vinhaça, consequentemente diluindo substâncias tóxicas, é a adição de um cossustrato com elevado conteúdo de carbono como a glicerina. A aplicação de glicerina como cossustrato pode também se apresentar como a solução para a sazonalidade da

cana-de-açúcar, uma vez que, poderia substituir a geração de energia a partir de vinhaça em períodos de entressafra.

Assim como a vinhaça, a glicerina é amplamente gerada no Brasil devido à crescente produção de biodiesel. Com atenção especial voltada para o estado de São Paulo (Figura 1), as proximidades entre as usinas de produção de etanol e as usinas produtoras de biodiesel no estado facilitariam a adição de glicerina à vinhaça, visto que, a glicerina pode ser facilmente armazenada em destilarias de cana devido à sua estabilidade e ausência de inflamabilidade.

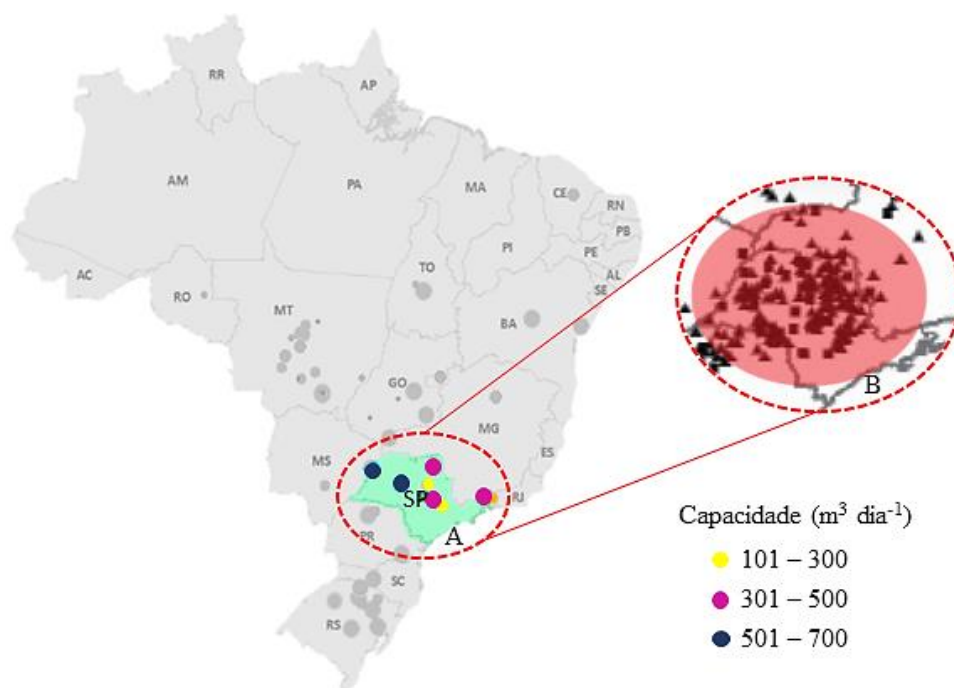


Figura 1. Mapa da localização aproximada das usinas de produção de biodiesel (A) e etanol (B) no estado de São Paulo (Fonte: adaptado da ANP, 2019)

A co-digestão e a co-fermentação de vinhaça e glicerol não foi suficientemente explorada. Lovato et al. (2019a) avaliaram a viabilidade de adicionar glicerina à vinhaça de cana-de-açúcar em diferentes modos de alimentação (batelada e batelada alimentada), proporções de vinhaça: glicerina (67%: 33%; 50%: 50%; 33%: 67% base em demanda química de oxigênio (DQO)), taxa de carregamento orgânico (TCO) (5; 7,5; 10  $\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$ ) e temperatura (30 – 35 °C). Os autores apontaram que para a carga de 5  $\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$  a produtividade de metano foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de glicerol. A partir deste resultado, o mais prudente foi adotar a proporção de vinhaça: glicerina intermediária (50%: 50%) na avaliação do efeito da TCO e da temperatura na produção de metano. O rendimento de metano (*methane yield*, MY) observado para a relação 50% vinhaça:



50% glicerol em 10,1 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi 93% da produção teórica de metano (350 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>).

Borges et al. (2021) também realizaram ensaios em batelada para co-digestão mesofílica (30 °C) de vinhaça e glicerina em diferentes proporções (70%: 30%; 50%: 50%; 30%: 70% base em DQO) e observaram, assim como Lovato et al. (2019a), que a utilização do glicerol como única fonte de carbono leva a produções de metano mais elevadas do que a mono-digestão de vinhaça. No entanto, enquanto Lovato et al. (2019a) apontaram que a produtividade de metano foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de glicerol, Borges et al. (2021) relataram maiores valores de MY (352 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) e eficiência de remoção de DQO (97%) em 50% vinhaça: 50% glicerol. O resultado destacado por Borges et al. (2021) mostra que a decisão de Lovato et al. (2019a) em adotar 50% vinhaça: 50% glicerol em testes adicionais de efeito da TCO e temperatura foi acertada. Isto ocorre porque a elevada biodegradabilidade do glicerol em baixas concentrações pode levar a elevados rendimentos de produção de metano. Porém, ao utilizar TCO mais elevadas para co-digestão, o que é desejável do ponto de vista econômico e operacional, a elevada biodegradabilidade do glicerol pode ocasionar acúmulo de ácidos e deterioração da produção de metano (ZAHEDI et al., 2018).

Os estudos que realizaram co-digestão de vinhaça e glicerina apresentaram resultados notáveis (LOVATO et al., 2019a; BORGES et al., 2021) e indicam que este procedimento é viável. Porém, a melhoria dos resultados obtidos depende de avaliação de co-digestão de vinhaça e glicerol em reatores de alta taxa, de avaliação de co-fermentação destes substratos e da análise de viabilidade de implantação da digestão de vinhaça e glicerol em dois estágios.

## **2 HIPÓTESES E OBJETIVOS**

Este estudo teve como hipótese central que a adição de glicerina como cossustrato à vinhaça de cana-de-açúcar permite a aplicação de taxas de carregamento orgânico mais elevadas na fermentação e digestão destes substratos, i. e., com melhores performances nas eficiências de remoção de matéria orgânica, rendimentos de hidrogênio e rendimentos de metano em relação às performances observadas na utilização de glicerina e vinhaça como substratos únicos. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi a avaliar os efeitos dos aumentos das taxas de carregamento orgânico nas performances da co-fermentação e da co-digestão de vinhaça e glicerina em reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALFs) operados em diferentes condições de temperatura, i.e., mesofílicas e termofílicas.

## 2.1 HIPÓTESES SECUNDÁRIAS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Hipótese secundária 1 (para a co-digestão de vinhaça e glicerina):** a co-digestão de vinhaça e glicerina em RALF resulta em maiores valores de remoção de matéria orgânica, produtividade de metano e MY do que a digestão de vinhaça e glicerina como mono-substratos. Além disso, a co-digestão possibilita a variação de temperatura dentro da faixa (hiper) termofílica sem alteração dos indicadores de desempenho do reator.

**Objetivo específico 1.1:** Na co-digestão de vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO) em RALF termofílico (55 °C) operado em modo contínuo, avaliar o efeito do aumento lento e escalonado da TCO de 2 para 5; 7,5; 10 e 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na eficiência de remoção de matéria orgânica e produtividade de metano.

**Objetivo específico 1.2:** Verificar se o aumento rápido da TCO de 2 até 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> em RALF termofílico (55 °C) operado em modo batelada resulta em valores de eficiência remoção de matéria orgânica e produtividade de metano similares, em operação em modo contínuo (15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>), aos observados no aumento lento e escalonado da TCO até 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

**Objetivo específico 1.3:** Analisar se o aumento da temperatura de 55 °C para 60 °C e 65 °C ocasiona em reduções da eficiência de remoção de matéria orgânica e da produtividade de metano em RALF alimentado com vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO) em concentração e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 10 g DQO L<sup>-1</sup> e 4 h, respetivamente.

**Hipótese secundária 2 (para co-fermentação de vinhaça e glicerina):** a co-fermentação termofílica de vinhaça e glicerina em RALF resulta em maior acidificação, rendimento de produção de hidrogênio e tolerância a TCO elevadas do que a mono-fermentação destes substratos. Adicionalmente, o aumento da temperatura na faixa (hiper) termofílica aumenta a seletividade de metabólitos produzidos e, conseqüentemente, o rendimento de produção de hidrogênio na co-fermentação de vinhaça e glicerina.

**Objetivo específico 2.1:** Avaliar o efeito do aumento da TCO de 60 para 90 e 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, pelo aumento da concentração de cossustratos em TDH fixo de 4 h, na

fermentação escura de vinhaça e glicerina em proporção fixa de 50%: 50% (base em DQO) em RALF termofílico (55 °C).

**Objetivo específico 2.2:** Avaliar o efeito da temperatura de 55 °C para 60 °C e 65 °C na produção de hidrogênio e metabólitos líquidos em RALF alimentado com concentração total de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50%) fixa de 10 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH fixo em 4 h.

**Hipótese secundária 3 (para co-digestão de efluente de reator acidogênico utilizado na co-fermentação de vinhaça e glicerina):** a co-digestão de efluente de RALF alimentado com vinhaça e glicerina (proporção 50%:50% em base DQO) resulta em eficiências de remoção de matéria orgânica e rendimentos de produção de metano mais elevados do que a co-digestão de vinhaça e glicerina em estágio único. Além disso, o RALF mesofílico alimentado com efluente de reator acidogênico (hiper) termofílico apresenta melhores performances de remoção de matéria orgânica e produção de metano do que o RALF (hiper) termofílico.

**Objetivo específico 3.1:** Na digestão de efluente de RALF acidogênico alimentado com vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO) em outro RALF termofílico (55 °C), avaliar o efeito do aumento lento e escalonado da TCO de 2 para 5; 7,5; 10 e 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na eficiência de remoção de matéria orgânica e produtividade de metano.

**Objetivo específico 3.2:** Comparar as performances de remoção de matéria orgânica e produtividade de metano de um RALF mesofílico (25 °C) alimentado com efluente de reator acidogênico em relação ao termofílico para TCOs acrescidas de 2 para 5; 7,5; 10 e 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

**Objetivo específico 3.3:** Avaliar o efeito de combinações de diferentes temperaturas de operação na co-digestão de 50% de vinhaça e 50% de glicerina (total de 10 g DQO L<sup>-1</sup>) em dois estágios: acidogênico termofílico (55 °C) – metanogênico termofílico (55 °C); acidogênico termofílico (60 °C) – metanogênico termofílico (60 °C); acidogênico hipertermofílico (65 °C) – metanogênico hipertermofílico (65 °C); acidogênico termofílico (55 °C) – metanogênico mesofílico (25 °C); acidogênico termofílico (60 °C) – metanogênico mesofílico (25 °C); acidogênico hipertermofílico (65 °C) – metanogênico mesofílico (25 °C).

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A presente seção contém consultas da literatura pertinentes para a contextualização deste estudo. Para a melhor compreensão do objetivo, da discussão dos resultados e da elaboração das conclusões os temas incluem: o setor sucoenergético e a geração de vinhaça; a digestão anaeróbia como alternativa de reaproveitamento da vinhaça; produção de hidrogênio e metano a partir da vinhaça; desafios observados na digestão de vinhaça como mono-substrato; co-digestão como alternativa de melhoria do desempenho da digestão de vinhaça; a glicerina como cossustrato; a indústria do biodiesel e a ampla geração de glicerina; utilização de glicerina como mono-substrato para produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol e metano; estudos que aplicaram glicerina como cossustrato na produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol e metano.

#### 3.1 VINHAÇA: DA GERAÇÃO AO REAPROVEITAMENTO

A cana de açúcar (*Saccharum spp.*) foi introduzida no Brasil ainda no período colonial, no ano de 1532, e atualmente é uma das culturas agrícolas mais expressivas no país (PAZUCH et al., 2017). Na safra 2020/2021 foram produzidos aproximadamente 654 milhões de toneladas de cana no Brasil, os quais resultaram em 41 milhões de toneladas de açúcar e 29 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2022). O açúcar e o etanol podem ser gerados a partir da cana em plantas que produzem somente açúcar, em plantas autônomas que produzem somente etanol e em plantas anexas de produção de açúcar e etanol (BERNAL et al., 2017). O modelo atual de produção integrada de açúcar e etanol foi proposto durante a crise do petróleo em 1956 que ocorreu simultaneamente à queda do preço do açúcar. Neste contexto, o governo brasileiro iniciou a substituição do petróleo importado por energia da biomassa (SOCCOL et al., 2010; DIAS et al., 2015). A partir de então, a situação favorável do etanol no Brasil impulsionou a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) promulgado pelo decreto n° 6593 de 1975. O Proálcool incentivou a geração intensa de etanol devido a fatores econômicos e ambientais. (ROSILLO-CALLE; CORTEZ, 1998; SOCCOL et al., 2010). Além disso, a produção de etanol foi utilizada como escape para adaptação da flutuação do preço do açúcar no mercado (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Na Figura 2 está apresentada a configuração de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, usina anexa de produção de açúcar e etanol, para exemplificar as etapas de produção de ambos os produtos (DIAS et al., 2015; SYDNEY et al., 2021).

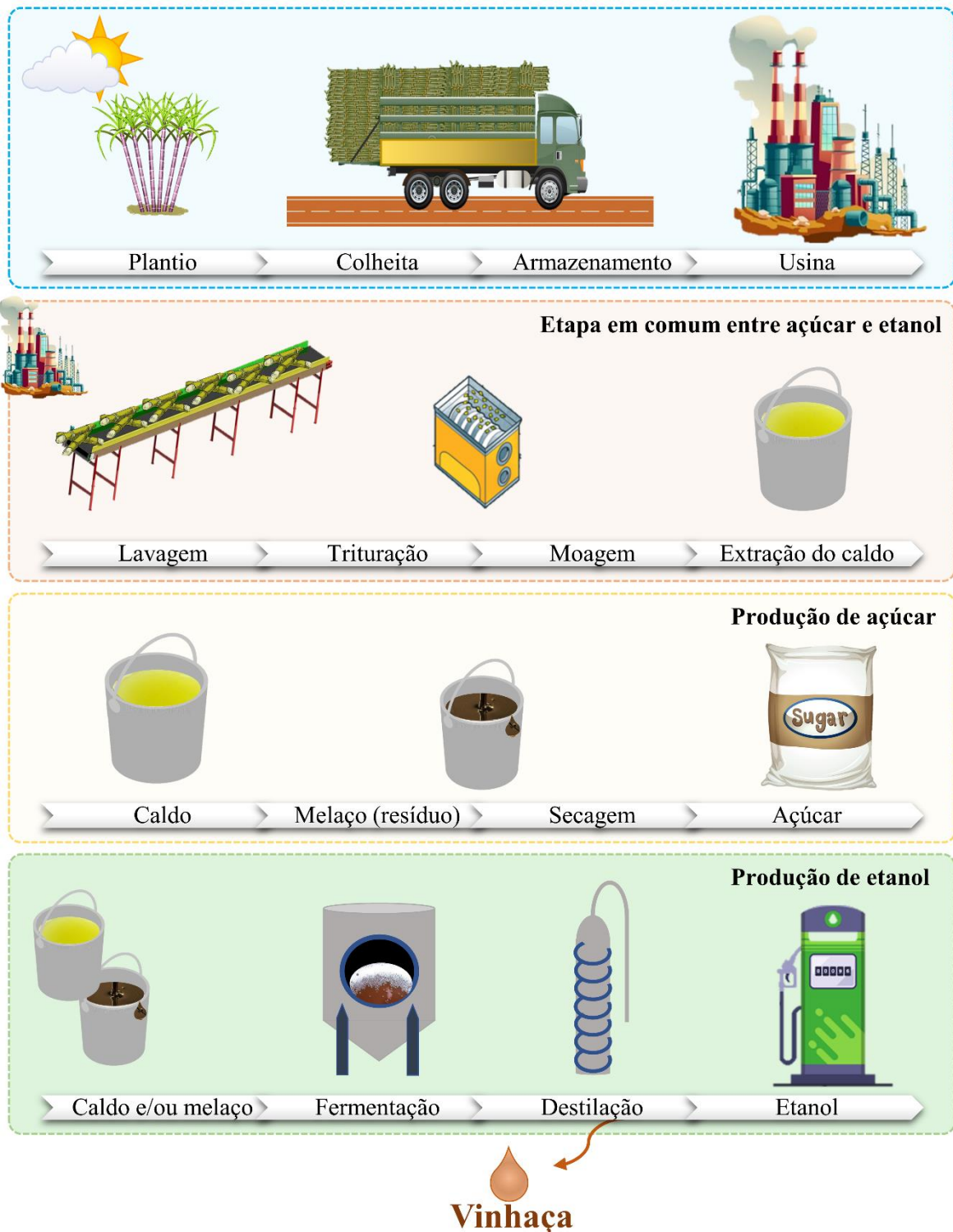


Figura 2. Sequência das etapas de produção de açúcar e etanol em uma usina anexa

Nas usinas anexas a seção inicial é comum para os dois produtos: plantio, transporte, armazenamento, lavagem, corte e moagem da cana-de-açúcar para extração do caldo (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000; DIAS et al., 2015). O caldo de cana é enviado para uma tela para retenção dos fragmentos de fibras. Usualmente, o caldo extraído no primeiro moinho é enviado

para produção de açúcar por conter maior pureza. O caldo dos demais moinhos, denominado caldo misto, é desviado para a produção de etanol. O etanol também pode ser produzido a partir do melão gerado na cristalização do açúcar e da mistura entre caldo e melão (MORAES et al., 2015). Em todos os casos, os substratos para produção de etanol são enviados para tanques de fermentação, que pode ocorrer em modos batelada, semi-contínuo ou contínuo (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). A fermentação é realizada por espécie de levedura (geralmente *Saccharomyces cerevisiae*) e origina fermentado com conteúdo alcoólico entre 2 e 12% (DIAS et al., 2015; MANOCHIO et al., 2017). Posteriormente, o fermentado é enviado para centrifugação visando remover as células de fermento que retornam ao processo. Para eliminar possíveis contaminantes da levedura centrifugada, as células passam por tratamento químico com ácido sulfúrico (DIAS et al., 2015). Já o fermentado é enviado para etapa de destilação, em que o etanol é separado e concentrado (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000).

No processo de destilação o etanol é separado do fermentado devido aos diferentes pontos de ebulição dos componentes da mistura. O fermentado é decomposto em dois fluxos: vapores com grau alcoólico entre 40 e 50 % e a vinhaça. O vapor segue para o processo de retificação para atingir grau alcoólico de 96 %. A condensação do vapor retificado gera como produto o etanol hidratado, que pode ser utilizado como combustível veicular. Entretanto, a produção do etanol anidro (99,7 % de grau alcoólico) requer uma etapa subsequente de desidratação. Assim como o etanol hidratado, o etanol anidro pode ser utilizado como combustível veicular. Para este fim, o anidro pode ser aplicado como aditivo à gasolina (MANOCHIO et al., 2017).

Todas as etapas do processo de produção de açúcar e etanol têm geração de resíduos. Nos campos de cultivo há a geração de palha, na moagem é gerado o bagaço, na produção de açúcar é gerado o melão como subproduto e na destilação de etanol o principal resíduo é a vinhaça. Porém, como o conceito de biorrefinaria inclui a extração máxima de produtos a partir da matéria prima (MORAES et al., 2015), grande parte dos resíduos gerados são reaproveitados para obtenção de outros produtos e energia. O material lignocelulósico gerado, majoritariamente composto de palha e bagaço, é queimado nas caldeiras para geração de energia. O etanol de segunda geração também é um método de reaproveitar os carboidratos oriundos da hidrólise deste material lignocelulósico. Como foi previamente mencionado, o melão é utilizado como aditivo ao caldo na geração de etanol de primeira geração (PANT; ADHOLEYA, 2007). Contudo, a intensa geração de vinhaça (11 a 14 litros por litro de etanol) limita as opções para a aplicação ambientalmente adequada deste resíduo (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000; SYDNEY et al., 2021).

A composição da vinhaça de cana-de-açúcar varia de acordo com o método de cultivo, o tipo de fermentação (batelada, semi-contínuo e contínuo), a eficiência de destilação e a adição de outros resíduos líquidos gerados na usina (água de lavagem da cana, licor de pentoses, água de resfriamento e água de limpeza de equipamentos) (PANT; ADHOLEYA, 2007). No geral, a vinhaça contém sais dissolvidos (potássio, cálcio e íons sulfato), aminoácidos, carboidratos (sacarose, glicose, xilose), compostos fenólicos (ácidos tânico e húmicos) e álcoois que conferem elevada concentração de matéria orgânica a este resíduo (DQO entre 15 e 299 g DQO L<sup>-1</sup>) (GODOI et al., 2019; PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019). Além disso, a vinhaça contém melanoidinas, um dos produtos da reação de Maillard que é favorecida em temperatura superior à 50 °C. As melanoidinas conferem coloração marrom à vinhaça, que em conjunto com os outros compostos podem causar sérios danos aos corpos hídricos, como: redução da infiltração de luz solar, redução da oxigenação e aumento da eutrofização. Por esse motivo, a legislação brasileira impede que a vinhaça seja lançada nos corpos hídricos (BERNAL et al., 2017). Nesse cenário, os destinos alternativos para a vinhaça são: evaporação, água de reposição na fermentação, fertirrigação e produção de energia (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Na evaporação a água é removida da vinhaça ocasionando em redução de volume. Contudo, este processo leva à incrustação de evaporadores pois o conteúdo de sólidos é mantido no resíduo. A vinhaça após evaporação, ou vinhaça concentrada, passa a ter elevados níveis de sais e baixas quantidades de carboidratos e fica inviável para alimentação animal (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Além disso, a vinhaça concentrada ocasiona decréscimo na produtividade de metano em digestão anaeróbia (RAMOS et al., 2021). Por outro lado, a incineração de vinhaça concentrada tem potencial para aumentar a geração de energia nas usinas (até 89,7 kWh t<sup>-1</sup> cana) (PALACIOS-BERECHE; PALACIOS-BERECHE; NEBRA, 2020). Na utilização de vinhaça como água de reposição na fermentação o volume total é reduzido e há economia de água e calor no processo. Porém, neste caso os rendimentos de produção de etanol são reduzidos e há um aumento da recalcitrância da vinhaça.

O destino mais comum para a vinhaça no Brasil atualmente é a fertirrigação, isto é, a aplicação de vinhaça nos campos de cultivo de cana como forma de reaproveitamento da água e dos nutrientes (SYDNEY et al., 2021). A fertirrigação é vantajosa devido ao aumento do pH do solo ocasionado pela inserção de cátions e consumo de íons H<sup>+</sup> por microrganismos. Ainda com relação aos microrganismos, o lançamento de vinhaça também proporciona aumento da atividade devido inserção de matéria orgânica no solo. Além disso, o lançamento de vinhaça provoca aumento da concentração de açúcares redutores na cana-de-açúcar. Em contrapartida,

a fertirrigação pode levar à sobrecarga orgânica do solo, entupimento dos poros do solo, redução da concentração de oxigênio dissolvido, emissão de odores desagradáveis, contaminação por íons específicos e contaminação do solo por metais tóxicos (FUESS; GARCIA, 2014; MORAES et al., 2014). Os impactos da fertirrigação também se estendem aos corpos hídricos. Isto porque a percolação do grande volume de vinhaça lançado no solo pode levar à contaminação dos lençóis freáticos e, por consequência, das águas superficiais (FUESS; GARCIA, 2014). Em conclusão, o aumento do volume de vinhaça gerado está atrelado ao aumento crescente da produção de etanol no país (CONAB, 2022). Este fato em conjunto com os problemas associados à fertirrigação e o desperdício do potencial energético da vinhaça fazem com que sejam necessárias alternativas para aproveitamento deste resíduo.

### **3.1.1 Alternativas para redução de impactos: digestão anaeróbia**

Os microrganismos são a base de dois tratamentos propostos para a vinhaça: o aeróbio e o anaeróbio. Apesar da estabilização da matéria orgânica ocorrer em tempo similar sob condições anaeróbia e aeróbia (MOTA; ARAÚJO; AMARAL, 2015), o consumo de energia para aeração em processos aeróbios são compensados pela produção de metano em processos anaeróbios (FUESS; GARCIA, 2015). Além disso, o volume de lodo gerado em reatores anaeróbios é significativamente menor do que os gerados em sistemas aeróbios (FUESS; GARCIA, 2015). O potencial energético da produção de metano a partir de vinhaça é considerado economicamente viável ( $2,24 \text{ TW h}^{-1}$ ) e superior a outras fontes de biogás do país (BERNAL et al., 2017). Em estudo de caso, a produção de biogás apresentou o maior acréscimo à queima do bagaço em sistema de turbina à vapor (PALACIOS-BERECHE; PALACIOS-BERECHE; NEBRA, 2021). Ainda, em comparação à evaporação de vinhaça, à incineração de vinhaça concentrada e o tratamento com membranas após a digestão anaeróbia, a digestão de vinhaça proporciona menor emissão de gases de efeito estufa (PALACIOS-BERECHE; PALACIOS-BERECHE; NEBRA, 2021). É válido mencionar que a vinhaça digerida ainda pode ser utilizada na fertirrigação. Neste último cenário os ganhos são de redução do conteúdo orgânico da vinhaça (prejudicial ao solo), redução da emissão de gases de efeito estufa e ganhos energéticos (MORAES et al., 2014).

Apesar de potencialmente vantajosa, a digestão de vinhaça para geração de biogás ainda contém obstáculos como: custos de investimento elevados, financiamento insuficiente de pesquisas, falta de incentivo à pequenas usinas na venda de crédito de carbono e falta de financiamento para agricultores e donos de usinas na implementação de plantas de digestão



anaeróbia (MORAES et al., 2015). Por outro lado, os esforços nas pesquisas em relação a manipulação dos parâmetros operacionais para aumentar a produtividade de metano e de outros compostos de valor agregado a partir da digestão de vinhaça podem ser observados nas últimas décadas. Para entender melhor a importância da manipulação dos parâmetros operacionais na digestão de vinhaça a teoria acerca da digestão anaeróbia deve ser explicitada.

#### *3.1.1.1 Digestão anaeróbia*

O processo de digestão anaeróbia é complexo e ocorre em múltiplas fases: i) hidrólise de materiais de elevado peso molecular em seus respectivos monômeros; ii) fermentação primária (acidogênese) dos monômeros em ácidos orgânicos, solventes, hidrogênio e dióxido de carbono e; iii) fermentação secundária (acetogênese e metanogênese) do acetato, hidrogênio e dióxido de carbono a metano (AGLER et al., 2011). Portanto, além do metano como produto na fermentação secundária, na fermentação primária podem ser gerados hidrogênio, metanol (MeOH), etanol (EtOH), butanol (BuOH), ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), ácido propiônico (HPr), ácido láctico (HLa), etc. O rendimento de produção de cada metabólito depende de parâmetros operacionais como composição bioquímica do substrato, configuração de reator, inóculo, temperatura, pH e TCO (WAINAINA et al., 2019).

As possíveis rotas da fermentação primária de glicose estão apresentadas na Figura 3, assim como as principais reações observadas na digestão de carboidratos podem ser observadas na Tabela 1. Mais informações acerca das condições operacionais para obtenção de cada metabólito são obtidas por meio da análise de pesquisas já realizadas (seções 3.1.2, 3.1.3 e 3.1.4).

### **3.1.2 Produção de metano a partir de vinhaça**

Na presente subseção são apresentados detalhadamente estudos que realizaram a digestão anaeróbia de vinhaça para produção de metano.

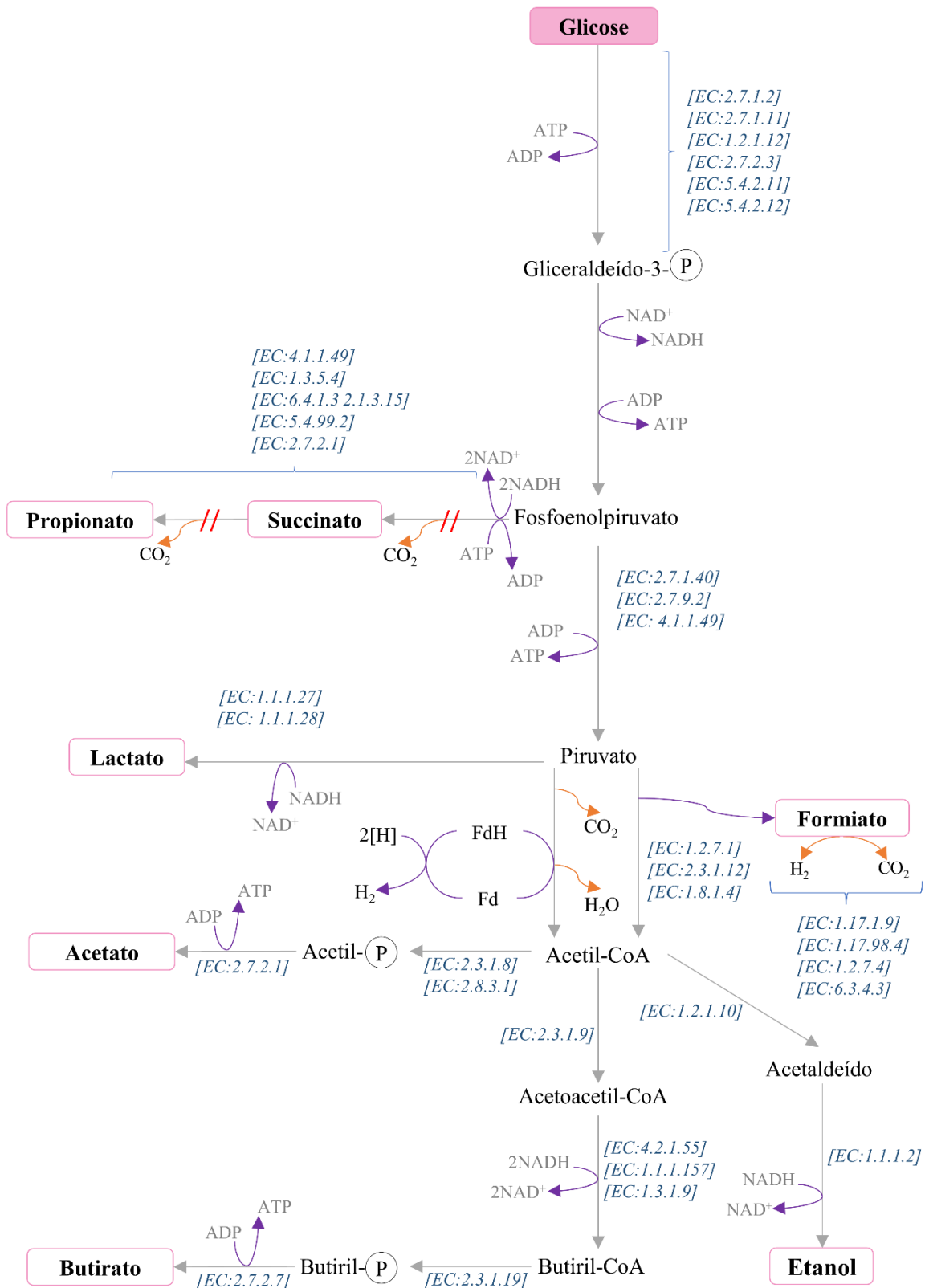


Figura 3. Possíveis rotas da fermentação primária de glicose ao inferir que a vinhaça é um substrato rico em carboidratos (Entre colchetes estão os números de comissão de enzima para os principais KO)

Tabela 1. Reações e variação da energia livre da digestão anaeróbia de carboidratos em diferentes temperaturas

Reação	$\Delta G_{T-25^{\circ}\text{C}}$	$\Delta G_{T-55^{\circ}\text{C}}$	$\Delta G_{T-60^{\circ}\text{C}}$	$\Delta G_{T-65^{\circ}\text{C}}$	Equação
	(kJ mol <sup>-1</sup> )				
Glicose + 4H <sub>2</sub> O → 2Acetato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 4H <sup>+</sup> + 4H <sub>2</sub>	-203.8	-219.9	-222.6	-225.3	(3.1)
Glicose + 2H <sub>2</sub> → Propionato <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub> O	-356.7	-364.7	-366.1	-367.4	(3.3)
Glicose + 2H <sub>2</sub> O → Butirato <sup>-</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 3H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	-252.1	-264.1	-266.1	-268.1	(3.2)
Glicose → Lactato <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup>	-194.3	-202.3	-203.7	-205.0	(3.4)
Glicose + 2H <sub>2</sub> O → Etanol + 2H <sup>+</sup> + 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-223.1	-231.1	-232.5	-233.8	(3.5)
Lactato + 2H <sub>2</sub> O → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	-4.8	-8.8	-9.4	-10.1	(3.6)
Lactato <sup>-</sup> + Acetato <sup>-</sup> → Butirato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-53.0	-53.0	-53.0	-53.0	(3.7)
Lactato + H <sub>2</sub> → Propionato <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	-81.2	-81.2	-81.2	-81.2	(3.8)

Nota: os cálculos de variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foram determinados de acordo com os parâmetros descritos por Kleerebezem; Van Loosdrecht, (2010). Os cálculos para cada temperatura de operação foram realizados considerando pH 7.

O parâmetro amplamente avaliado nos estudos de produção de metano a partir de vinhaça foi a TCO. Isto ocorre porque a possibilidade de aplicação de TCO elevada sem deterioração na produtividade de metano está atrelada ao tratamento de grandes volumes de vinhaça (RAMOS et al., 2021). O aumento da TCO pode ser realizado por meio do aumento da concentração de matéria orgânica em TDH fixo (RAMOS et al., 2021), ou da redução do TDH com concentração de matéria orgânica fixa (BALAGUER; VICENT; PARÍS, 1992). Balaguer, Vicent e París (1992) avaliaram o efeito do aumento da TCO de 9 para 36 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> pela redução do TDH de 2 dias para 0,5 dia na produção de metano a partir de resíduo de destilaria em RALF mesofílico (35 °C). Os autores observaram aumento da remoção de matéria orgânica de 72,2% para 88,6% com o aumento da TCO de 9 para 24,3 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Para essas TCOs, o pH do efluente do reator permaneceu constante entre 8,1 e 8,9 com relação entre alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial (relação AI/AP) entre 0,16 e 0,30. No entanto, ao reduzir o TDH para 0,5 dias a remoção de matéria orgânica caiu para 70,6%, o pH caiu para 7,6, e a relação AI/AP aumentou para 0,36. Apesar do decréscimo da conversão de matéria orgânica e do aumento da relação AI/AP, que segundo os autores ainda indica estabilidade do sistema, o decréscimo do TDH de 2 para 0,5 dia ocasionou aumento da produção volumétrica de metano (PVM) de 2,61 para 10,7 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. Por sua vez, os MY foram de 350 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, 360 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> e 280 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> nos TDHs de 1,5 dias; 0,74 dia e 0,5 dia, correspondendo à 89,7%, 92,3% e 71,8%, respectivamente, do MY em 35 °C (390 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>).

Souza, Fuzaro e Polegato (1992) utilizaram reator UASB em escala real instalado na usina produtora de açúcar e etanol São Martinho (Pradópolis, São Paulo, Brasil) para digestão termofílica (55 °C) de vinhaça de cana-de-açúcar. Após a etapa de adaptação do reator, este passou a operar em TDH de 10,8 h (TCO de 26,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). Foi observada conversão média de matéria orgânica igual a 71,7% com %CH<sub>4</sub>, PVM e MY iguais à 60%, 9,8 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, 370 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> (em 55 °C), respectivamente. Para a manutenção do pH do reator foi adicionado 4 g NaOH g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>, diferentemente de Balaguer, Vicent e París (1992), que não adicionaram agente tamponante na alimentação do RALF mesofílico (35 °C).

Doll e Foresti (2010) realizaram a comparação entre a digestão termofílica (55 °C) e a digestão mesofílica (35 °C) de vinhaça de cana-de-açúcar em reator anaeróbico operado em bateladas sequenciais (*anaerobic sequencing batch biofilm reactor*, AnSBBR). Os autores observaram que para a estabilização do processo anaeróbico no reator termofílico foram necessários de 0,6 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> – 1,2 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>, enquanto no reator mesofílico foram necessários entre 0,2 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> – 0,4 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>, e apontaram que o reator mesofílico apresentou maior estabilidade operacional que o reator termofílico. Enquanto o melhor desempenho foi observado no reator mesofílico até TCO de 35,9 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>, no reator termofílico a TCO ótima foi entre 4,5 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup> e 5,24 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>. Isto provavelmente ocorreu devido a maior taxa de hidrólise e acidogênese e condição termofílica em comparação à mesofílica (SÁNCHEZ et al., 2021). Neste caso, a maior taxa de hidrólise leva à acidificação do reator.

Eskicioglu et al. (2011) também compararam a digestão termofílica (55 °C) com a digestão mesofílica (35 °C) de vinhaça da produção de EtOH a partir de milho. Os autores apontaram que o melhor desempenho mesofílico em relação ao termofílico pode ser atribuído ao acúmulo de ácidos no reator termofílico devido à redução da estabilidade fisiológica e à presença de menor variedade de bactérias em temperaturas elevadas. Segundo Boncz et al. (2012), a rápida acidificação é seguida pela inibição da produção de metano, que pode ser evitada pela adição de agente tamponante na alimentação do reator. Portanto, justificando a maior quantidade de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) adicionada por Doll e Foresti (2010) na alimentação do reator termofílico em relação ao reator mesofílico.

Siqueira, Damiano e Silva (2013) utilizaram RALF mesofílico (30 °C) para digestão de vinhaça de cana-de-açúcar com concentrações acrescidas de 2,27 para 20,07 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 24 h. Os autores observaram aumento da alcalinidade parcial no efluente do RALF de 918 para 7.275 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> com o aumento da TCO de 3,3 para 26,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Apesar da geração de alcalinidade à bicarbonato a relação AI/AP aumentou de 0,38 para 0,87 com o aumento da carga aplicada, indicando acúmulo de ácidos no reator (53% de HAc e 22% de HPr). O acúmulo de ácidos também pode ser verificado pela redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 70% para 51% ao aumentar a TCO de 19,9 para 26,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Similarmente a Balaguer, Vicent e París (1992), Siqueira, Damiano e Silva (2013) observaram PVM máxima (5,37 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) na maior TCO aplicada, porém, o MY máximo (370 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, ou seja, 97,4% do teórico à 30 °C) foi observado em TCO intermediária (10,33 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). Nas demais concentrações aplicadas o MY permaneceu em 84,2% do valor teórico.

Albanez et al. (2016a) realizam a digestão mesofílica (30 °C) de vinhaça de cana-de-açúcar em AnSBBR com concentração de vinhaça acrescida de 1 para 5 g DQO L<sup>-1</sup>. Ao aumentar a concentração para 3 g DQO L<sup>-1</sup> os autores observaram aumento da remoção de DQO de 70% para 84%, que se manteve constante ao aumentar a concentração de vinhaça para 4 e 5 g DQO L<sup>-1</sup>. O aumento da concentração de 1 para 5 g DQO L<sup>-1</sup>, e consequente aumento da TCO de 1,22 para 5,54 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, acarretou também aumento do %CH<sub>4</sub> de 49,5% para

77% e da PVM de 0,03 para 0,97 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. O MY máximo de 10,3 mol CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> (64,4% do teórico à 30 °C, 16 mol CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) foi observado para TCO de 4,41 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>. Contudo, o incremento da TCO para 5,54 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> levou à redução do MY para 9,47 mol CH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>.

Também sob condições mesofílicas (20 °C – 30 °C), Barros, Duda e Oliveira (2016) realizaram a digestão de vinhaça de cana-de-açúcar em dois reatores UASB, denominados UASB 1 para TCO acrescida de 0,2 a 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, e UASB 2 para TCO acrescida de 0,2 a 11,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. A relação AI/AP nos reatores permaneceu entre 0,18 e 0,35 para as TCO entre 0,2 e 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Contudo, no UASB 2 a relação AI/AP aumentou para 0,86 em TCO de 11,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, indicando acúmulo de ácidos no reator. Este acúmulo foi reafirmado ao observar redução da conversão de matéria orgânica de 81% para 70% no UASB 2. O %CH<sub>4</sub> decresceu de 83% para 69% no UASB 1 e de 85% para 64% no UASB 2 ao aumentar a carga nos reatores. Porém, os maiores valores de PVM (0,8 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 1,3 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) e MY (133 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> e 181 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) nos UASB 1 e UASB 2, respectivamente, foram observados nas maiores TCO aplicadas.

Almeida et al. (2017) avaliaram o efeito da concentração de vinhaça de cana-de-açúcar (1 g DQO L<sup>-1</sup> a 10 g DQO L<sup>-1</sup>) na produção de metano em AnSBBR mesofílico (35 °C). A PVM máxima de 2,77 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> foi observada para a maior concentração aplicada (TCO de 10,07 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). O MY máximo de 302 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> foi observado para TCO de 8,18 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Para a TCO de 10,07 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> também foi avaliado o efeito da temperatura, com realização de ensaio à 45 °C. A PVM em 45 °C foi de 0,79 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e o MY foi de 160 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, contra MY de 281 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em 35 °C na mesma TCO aplicada. A TCO em que foi observado MY máximo no AnSBBR operado a 35 °C (8,18 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>) (ALMEIDA et al., 2017) foi 2-vezes superior à TCO em que foi observado MY máximo a 30 °C (ALBANEZ et al., 2016a). Adicionalmente, a TCO em que foi observado MY máximo em AnSBBR mesofílico foi inferior as reportadas para digestão de vinhaça em UASB (11,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016) e RALF (10,33 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) (SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2013). Portanto, além do efeito da TCO na produção de metano, é possível visualizar os efeitos da temperatura de operação e da configuração de reator utilizada na digestão de vinhaça.

Aquino, Fuess e Pires (2017) compararam as performances dos reatores anaeróbios de leito estruturado (*structured bed reactor*, FVR) e leito empacotado (*packed bed reactor*, PBR) na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar sob condições mesofílicas (30 °C). Os reatores foram iniciados em TCO de 0,8 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup> com TDH fixo de 60 h.

Após adaptação dos FVR e PBR, a concentração de vinhaça foi acrescida de 6 para 18 g DQO L<sup>-1</sup>, resultando em aumento da TCO de 2,4 para 7,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Em seguida, para concentração fixa em 18 g DQO L<sup>-1</sup> o TDH foi decrescido para 48, 30 e 24 h. Para a manutenção da relação AI/AP estável entre 0,20 e 0,35 em ambos os reatores foi necessária adição de agente tamponante (0,3 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO). Contudo, ao aumentar a TCO para 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> no PBR, foi observado aumento da relação AI/AP para 0,66. Já no FVR o aumento da relação AI/AP para 0,65 foi observado somente ao aumentar a TCO para 18 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. A remoção de DQO decresceu de 73% para 54% no FVR e de 82% para 58% no PBR ao aumentar a TCO de 15 para 18 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O MY no FVR permaneceu constante entre 300 e 310 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em todas as TCO aplicadas (2,4 - 18 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). Entretanto, o MY no PBR decresceu de 310 para 180 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em 7,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Ao observar o conjunto de indicadores de desempenho é possível atestar que a performance do FVR foi superior a performance do PBR na aplicação de TCOs elevadas.

Sosa-Villalobos et al. (2018) avaliaram o efeito do decréscimo do TDH de 24 para 1 dia na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em reator UASB (35 °C) mantendo a TCO fixa em 6 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>. A remoção de DQO se manteve entre 57% e 63% em todos os TDH aplicados. O MY foi de 315 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> (calculado a partir dos dados originais) em TDH de 24 dias. Foi observado aumento do MY de 252 para 322 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> ao reduzir o TDH de 12 dias para 3 dias. Os valores de MY permaneceram constantes em 320 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> ao reduzir o TDH para 1 dia. Os autores observaram que o decréscimo do TDH para TCO fixa apresentou desempenho satisfatório na produção de metano devido à maior diluição da vinhaça, uma vez que, resultou em diluição de compostos inibitórios à metanogênese como o sulfato.

Além de possibilitar TDH de 1 dia (SOSA-VILLALOBOS et al., 2018), o reator UASB piloto operado em temperatura ambiente (22 ± 3 °C) também permitiu a aplicação de TCO tão elevada quanto 30 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na digestão de vinhaça (DEL NERY et al., 2018). Del Nery et al. (2018) reportaram que o aumento da TCO em passos de 0,3 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> até atingir 30 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> com TDH decrescido de 33 dias a 0,86 dia foi o responsável pela estabilidade da eficiência de remoção de matéria orgânica em 87,5%. A produção de metano do reator foi verificada em TCO de 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, em que os autores observaram %CH<sub>4</sub> de 65%, MY de 299 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> (76% do MY teórico a 25 °C, i. e., 391 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) e PVM aproximada de 8,63 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. Portanto, a partida do reator e adaptação do inóculo é a chave para estabilidade da digestão de vinhaça.

de Albuquerque et al. (2019) avaliaram a estratégia de partida e o efeito do aumento da TCO na produção de metano a partir de vinhaça em AnSBBR termofílico (55 °C). A partida do reator foi realizada pela adição de melão, substituída gradualmente pela adição de vinhaça em TCO fixa. Os autores reportaram que a adaptação do sistema foi percebida por meio da estabilidade na alcalinidade à bicarbonato no efluente do reator. Posteriormente, o aumento da TCO de 5 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi realizado em modo batelada. O maior valor de PVM (6,8 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) foi observado na maior TCO aplicada (20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e o maior valor de MY (365 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) foi observado em 14 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Então, a performance do AnSBBR termofílico foi superior à do mesofílico (ALMEIDA et al., 2017). Contudo, é válido mencionar que o MY máximo do AnSBBR termofílico foi superior ao teórico em CNTP (350 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>). Os autores atribuíram esta ocorrência a matéria orgânica (DQO) indevidamente contabilizadas nas análises de efluente.

A estratégia de partida também foi avaliada por Caillet e Adelard (2021) na produção de metano em digestor semi-contínuo mesofílico (37 °C). Os autores realizaram aumento lento da TCO de 0,45 para 1,51 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> variando o modo de agitação entre contínua e mínima. A partir do aumento da frequência de alimentação de 2 para 3 e 4 dias do quadragésimo sexto dia de operação (considerado como estágio estacionário) também foi realizado aumento da TCO de 1,51 para 2,26 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O MY máximo igual a 179,4 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> foi observado na máxima TCO aplicada. A eficiência de remoção de matéria orgânica durante a partida foi de 51%. Porém, em estado estacionário foi observado aumento da remoção de matéria orgânica para 84,3%. Os baixos valores de MY observados ocorreram provavelmente devido à baixa disponibilidade de matéria orgânica, uma vez que, a máxima TCO aplicada foi inferior às consideradas ótimas para a digestão deste substrato em batelada (8 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) (ALMEIDA et al., 2017).

Como a digestão anaeróbia é intermediada por microrganismos, a composição e interação desses agentes é fundamental para o sucesso do processo. Neste sentido, Callejas et al. (2021) compararam a comunidade microbiana de um reator UASB alimentado com vinhaça em três períodos da operação: na partida e primeira safra, na segunda safra e na segunda entressafra. A comunidades na partida e na primeira safra foram similares. Contudo, na segunda safra foi observada redução da diversidade de microrganismos quando comparada à primeira. Um posterior aumento da diversidade na segunda entressafra foi observado. Apesar da redução da diversidade na segunda safra, os autores apontaram que a produção de metano permaneceu constante, indicando maior adaptação da comunidade à vinhaça.



### 3.1.3 Produção de hidrogênio a partir de vinhaça

Além do reaproveitamento do potencial energético da vinhaça em processos anaeróbios por meio da produção de  $\text{CH}_4$ , também é possível obter hidrogênio (SANTOS et al., 2014a; RAMOS; SILVA, 2017; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019). O hidrogênio é renovável, neutro em carbono e contém elevado conteúdo energético ( $142 \text{ kJ g}^{-1}$ ) (FERREIRA et al., 2019). Diferentemente da produção biológica de  $\text{CH}_4$ , em que as máximas TCO aplicadas reportadas são entre  $25$  e  $30 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  (BARROS et al., 2017; DEL NERY et al., 2018; SOSA-VILLALOBOS et al., 2018), são identificados estudos que aplicaram TCO de até  $720 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  na produção de hidrogênio a partir de vinhaça (SANTOS et al., 2014b; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021). Além da influência da TCO (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; RAMOS; SILVA, 2017), é possível ver a influência dos demais parâmetros operacionais como temperatura (LAZARO et al., 2014) e pH (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019; MAGRINI et al., 2020) na eficiência de produção de  $\text{H}_2$  a partir deste resíduo. A compilação dos principais parâmetros operacionais (tipo de reator, concentração de vinhaça, TDH, pH e temperatura) que renderam maior produção de hidrogênio na fermentação de vinhaça são apresentados na Tabela 2.

Buitrón e Carvajal (2010) avaliaram o efeito do TDH (24 h e 12 h) e da variação da concentração de resíduo de destilaria (vinhaça de tequila) de  $0,5$  a  $3,0 \text{ g DQO L}^{-1}$  em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , e de  $1,0$  a  $5,0 \text{ g DQO L}^{-1}$  em  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  na produção de hidrogênio em ASBR. Apesar da descarga de vinhaça ocorrer em temperaturas entre  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , os autores justificaram a escolha da faixa mesofílica devido ao frequente armazenamento da vinhaça em tanques, acarretando grandes volumes desse resíduo em temperatura ambiente. Ao avaliar os resultados de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) é possível observar que na faixa mesofílica, o melhor desempenho ocorreu para o reator em  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , visto que, a PVH máxima para  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  foi de  $172,8 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  em TDH de 24 h contra  $343,2 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  para  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  no mesmo TDH. Para o reator à  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  foi observada também performance superior no TDH de 12 h (máximo de  $1.212,0 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) quando comparado ao TDH de 24 h (máximo de  $444,0 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ), corroborando a afirmação dos autores de que a produção de hidrogênio é favorecida em TDH reduzidos.

Tabela 2. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de vinhaça

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> dia <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	pH	HY (mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>aplicada</sub> )	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
ASBR <sup>a</sup>	3,0	6,0	35	Cultura mista	12	-	-	1.212	(BUITRÓN; CARVAJAL, 2010)
	20,0	37,5			13		178	-	
ASBR <sup>b</sup>	40,0	60,0	37	Cultura mista	16	5,5	172	-	(SEARMSIRIMONG KOL et al., 2011)
	60,0	112,5			13		80 <sup>c</sup>	-	
ASBR	60,0	68,0	55	Cultura mista	21,3	5,5	30 <sup>d</sup>	-	(INTANOO et al., 2012)
Batelada	7,0	-	37	Cultura mista	-		2,23	-	(LAZARO et al., 2014)
	2,0	-	55		-		2,31	-	
APBR	36,2	72,4	55	Cultura mista	12	4,9-5,3	0,30	527	(FERRAZ JÚNIOR et al., 2014)
RALF	5,0	60,0	55	Cultura mista	2	4,1-4,3	3,00	14.400	(SANTOS et al., 2014c)
RALF	10,0	40,0	55	Cultura mista	6		2,80	9.600	(SANTOS et al., 2014b)
	30,0	120,0			6	4,5-4,9	0,79	14.400	

Tabela 2. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de vinhaça

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> dia <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	pH	HY (mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>aplicada</sub> )	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
RALF	15,0	60,0	55	Cultura mista	6	4,2-4,6	2,23	10.800	(SANTOS et al., 2014a)
	20,0	80,0	55		6		1,85	12.960	
RALF	5,0	60,0	22	Cultura mista	1	4,0-5,0	1,96	13.680	(REIS et al., 2015)
APBR	36,4	36,4	25	Cultura mista	24	5,5	0,30 <sup>e</sup>	404	(FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015b)
APBR	35,8	84,2	55	Cultura mista	10,2	5,2-5,7	1,10 <sup>e</sup>	762	(FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a)
RALF	10,0	60,0	55	Cultura mista	4	4,6-5,0	1,64	8.640	(RAMOS; SILVA, 2018)
AnSTBR	40,0	41,9	55	Cultura mista	25,4	5,45	3,10	755	(FUSS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019)
AnSTBR	32,3	40,8	70	Cultura mista	19	5,5-7,5	1,8 <sup>f</sup>	628	(NIZ et al., 2019)

Tabela 2. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de vinhaça

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> dia <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	pH	HY (mmol H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>aplicada</sub> )	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
ASBR	10,0	10,0	36	Cultura mista	24	5,5	-	674	(POURESMAEIL; NOSRATI; EBRAHIMI, 2019)
Batelada	20,0	-	37	Cultura mista	-	6,0	4,75	2.730 <sup>g</sup>	(MAGRINI et al., 2020)
Batelada	20,8	-	37	<i>Bacillus cereus</i>	-	6,0	5,40	-	(EDER et al., 2020)
RALF	5,0	60,0	30	Cultura mista	2	4,5-5,2	0,27	800	(REGO et al., 2020)
	5,0	60,0	55		2	4,5-5,2	1,06	6.400	
EGSB	15,0	720,0	30	Cultura mista	1	4,6-4,8	0,33	8.770	(BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021)

APBR: *anaerobic packed bed reactor*, reator de leito empacotado; ASBR: *anaerobic sequencing batch reactor*, bateladas sequenciais; AnSTBR: *anaerobic structured bed reactor*, reator anaeróbio de leito estruturado; EGSB: *expanded granular sludge bed*, reator anaeróbio de leito granular expandido; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado; a: vinhaça de tequila; b: resíduo de destilaria; c: mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>; d: mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>; e: mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>; f: mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicose; g: mL H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>

Também avaliando o efeito do decréscimo do TDH de 32 h para 13 h, Searmsirimongkol et al. (2011) aplicaram concentrações elevadas de resíduo de destilaria (20, 40 e 60 g DQO L<sup>-1</sup>) na produção de hidrogênio em ASBR (37 °C) visando avaliar a tolerância das bactérias hidrogenogênicas à toxicidade do potássio e sulfato. Os autores observaram aumento dos valores e HY para 178 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> e 80 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em 20 g DQO L<sup>-1</sup> e 60 g DQO L<sup>-1</sup>, respectivamente, ao reduzir o TDH de 32 h para 13 h. Já para a concentração afluyente igual a 40 g DQO L<sup>-1</sup>, o HY máximo de 172 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> foi observado no TDH de 16 h. O aumento da produção de hidrogênio com o aumento da TCO em cada concentração foi atribuído pelos autores ao aumento da produção de H<sub>Bu</sub> e redução da produção de H<sub>Pr</sub> com o decréscimo do TDH. Contudo, ao comparar as 3 concentrações de vinhaça aplicadas foi constatada inibição pela composição do substrato, uma vez que, o HY em 20 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH de 13 h foi superior aos HYs observados em 40 g DQO L<sup>-1</sup> e 60 g DQO L<sup>-1</sup> no mesmo TDH.

Intanoo et al. (2012) aplicaram resíduo de destilaria em concentração igual a 60 g DQO L<sup>-1</sup> na produção de hidrogênio em ASBR sob condição termofílica (55 °C). Diferentemente dos estudos de Buitrón e Carvajal (2010) e Searmsirimongkol et al. (2011), Intanoo et al. (2012) realizaram fermentação em condição termofílica devido à possibilidade de obtenção de HY mais elevados do que os observados na faixa mesofílica. O decréscimo do TDH de 32 h para 21,3 h levou ao aumento do HY para 130 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>. De fato, o HY observado pelos autores para concentração igual a 60 g DQO L<sup>-1</sup> (130 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) em ASBR termofílico, foi superior ao HY do estudo de Searmsirimongkol et al. (2011) para a mesma concentração em ASBR mesofílico (37 °C, 80 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>). Assim como Searmsirimongkol et al. (2011), Intanoo et al., (2012) verificaram que a TCO limitante para obtenção de HY máximo foi ~68 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Isto porque foi observada redução do HY ao decrescer o TDH para 18,3 h. Então, os autores concluíram que concentrações de HAc superiores a 10 g DQO L<sup>-1</sup> são tóxicas aos microrganismos na produção de hidrogênio a partir de resíduo de destilaria.

Lazaro et al. (2014) avaliaram o efeito da concentração de vinhaça de cana-de-açúcar (2, 5, 7 e 12 g DQO L<sup>-1</sup>) na produção de hidrogênio em ensaios batelada conduzidos sob condições mesofílica (37 °C) e termofílica (55 °C). Os autores observaram HY entre 1,72 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> e 2,23 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> para temperatura igual a 37 °C em todas as concentrações aplicadas (2 - 12 g DQO L<sup>-1</sup>). Nos reatores operados a 55 °C foi possível observar HY superiores para as menores concentrações de vinhaça aplicadas (2,31 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> e 1,09 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> para 2 g DQO L<sup>-1</sup> e 5 g DQO L<sup>-1</sup>, respectivamente) e

HY inferiores para as maiores concentrações de vinhaça aplicadas ( $0,59 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  e  $0,44 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  para  $7 \text{ g DQO L}^{-1}$  e  $12 \text{ g DQO L}^{-1}$ , respectivamente). É possível observar que o HY máximo para a condição termofílica ( $2,31 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) foi superior ao HY máximo para a condição mesofílica ( $2,23 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ). Porém, a condição mesofílica apresentou maior tolerância dos microrganismos aos compostos inibitórios. Uma observação análoga pode ser feita com relação aos estudos de Searmsirimongkol et al. (2011) e Intanoo et al. (2012), em que o HY do ASBR termofílico foi superior ao HY do ASBR mesofílico. Contudo, no ASBR mesofílico do estudo de Searmsirimongkol et al. (2011) o HY apresentou tendência de crescimento com o decréscimo do TDH, enquanto no ASBR termofílico do estudo de Intanoo et al. (2012), a redução do TDH ocasionou redução do HY.

Ferraz Júnior et al. (2014) avaliaram o efeito do TDH (24, 16, 12 e 8 h) na produção fermentativa de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em APBR termofílicos ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Além da justificativa apontada por Intanoo et al. (2012), Ferraz Júnior et al. (2014) atribuíram a escolha da faixa termofílica à redução da pressão parcial de hidrogênio no sistema, uma vez que, o hidrogênio é menos solúvel em temperaturas elevadas e pode ser desprender mais facilmente do meio líquido. Além disso, temperaturas elevadas contribuem para eliminação de microrganismos autóctones da vinhaça que são não-produtores de hidrogênio. Os autores observaram remoção de carboidratos superior à 67% em todos os TDH aplicados. Os HY e PVH máximos de  $0,3 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  e  $526,8 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ , respectivamente, foram observados em TDH de 16 h e TCO igual a  $72,4 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

O efeito do decréscimo do TDH de 6 h para 1 h também foi avaliado por Santos et al. (2014b) na fermentação de vinhaça diluída ( $10 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) e *in natura* ( $30 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) em RALFs termofílicos ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os autores observaram que o decréscimo do TDH para 1 h acarretou aumento da PVH para  $47.040$  e  $19.440 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  nos reatores com concentração afluyente igual à  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  e  $30 \text{ g DQO L}^{-1}$ , respectivamente. Os HY máximos do estudo dos autores foi de  $2,8 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  para a TCO de  $40 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no reator alimentado com  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  e de  $0,79 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  para a TCO de  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no reator alimentado com  $30 \text{ g DQO L}^{-1}$ . Ao comparar os reatores contínuos do estudo de Ferraz júnior et al. (2014) e Santos et al. (2014b) é possível observar que o RALF apresentou desempenho superior ao do APBR.

Santos et al. (2014a) utilizaram dois RALF para produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar ( $15$  e  $20 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) sob condições termofílicas ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os autores observaram aumento da PVH de  $10.800$  para  $35.760 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  ao reduzir o TDH de 6 h

para 1 h no RALF alimentado com 15 g DQO L<sup>-1</sup>. O aumento da PVH de 12.960 para 28.800 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> também foi observado ao reduzir o TDH de 6 h para 1 h no RALF alimentado com 20 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça de cana-de-açúcar. Os HY máximos nos RALF alimentados com 15 g DQO L<sup>-1</sup> e 20 g DQO L<sup>-1</sup> foram de 2,23 e 1,75 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> em TCOs de 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 80 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente. As TCOs ótimas do estudos dos autores em RALF termofílico foram próximas às TCO ótimas apontadas por Ferraz Júnior et al. (2014) em APBR termofílico (72 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>), por Intanoo et al. (2012) em ASBR termofílico (68 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e por Searmsirimongkol et al. (2011) em ASBR mesofílico (60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). Também é válido mencionar que a aplicação de vinhaça em concentração de 20 g DQO L<sup>-1</sup> retornou HY inferior à concentração de 15 g DQO L<sup>-1</sup> (2,23 e 1,75 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>, respectivamente) em TCOs similares, provavelmente devido a maior concentração de compostos inibitórios em vinhaça menos diluída, similarmente ao apontado por Intanoo et al. (2012).

No caso da fermentação de vinhaça em RALFs mesofílicos (22 °C), Reis et al. (2015) observaram aumento da PVH para 13.680 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> ao reduzir o TDH de 6 h para 1 h no reator com concentração de vinhaça afluyente igual a 5 g DQO L<sup>-1</sup>. Neste mesmo reator e TDH os autores observaram HY igual a 1,96 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>. Já no reator com concentração afluyente igual à 10 g DQO L<sup>-1</sup>, o aumento do %CH<sub>4</sub> no biogás para aproximadamente 25% nos TDH de 6 h a 1 h acarretou decréscimo da PVH e do HY para 480 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 0,01 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>, respectivamente. Portanto, no estudo dos autores não é possível inferir se o efeito deletério da aplicação de vinhaça menos diluída ocasionou menor PVH e HY em 10 g DQO L<sup>-1</sup> em relação a 5 g DQO L<sup>-1</sup>, ou se o desempenho do reator com 10 g DQO L<sup>-1</sup> foi inferior ao do reator com 5 g DQO L<sup>-1</sup> devido à produção de metano. Vale ressaltar que a produção de metano no RALF mesofílico ocorreu apesar da manutenção do pH entre 4 – 5 e TDH tão baixo quanto 1 h.

Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015b) também em condições mesofílicas (25 °C) avaliaram o efeito do material suporte (argila expandida, carvão, cerâmica porosa e polietileno de baixa densidade) na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar bruta (36,4 g DQO L<sup>-1</sup>) em APBR com TDH fixo de 24 h. Os melhores resultados no estudo dos autores foram observados ao utilizarem polietileno de baixa densidade e argila expandida como materiais suporte. Para a argila expandida, mesmo material suporte utilizado no RALF mesofílico do estudo de Reis et al. (2015), a PVH e o HY foram de 404 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 0,3 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente.

Ferraz Júnior, Etchebere e Zaiat (2015a) utilizaram vinhaça de cana-de-açúcar bruta para produção de hidrogênio em APBR termofílico (55 °C) em TDH e TCO fixos de 10,2 h e 84,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente. Os autores observaram conversão de carboidratos média de 73%, além de PVH e HY médios de 762 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 1,1 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>. Os valores médios de PVH (762 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) e HY (1,1 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) observados no APBR termofílico foram superiores aos observados na operação do APBR mesofílico (404 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 0,3 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente) (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015b). Similarmente, a performance do RALF mesofílico (13.680 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 1,96 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) (REIS et al., 2015) foi inferior à do RALF termofílico (14.400 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 3,00 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) (SANTOS et al., 2014c) na fermentação de vinhaça diluída (5 g DQO L<sup>-1</sup>). Estes dados evidenciam que a fermentação contínua de vinhaça para produção de hidrogênio, tanto com elevada concentração de compostos inibitórios quanto diluída, é favorecida em condição termofílica em relação a mesofílica.

A avaliação do efeito do aumento da temperatura de termofílica (55 °C) para hipertermofílica (65 °C e 75 °C) na fermentação de 10 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça em RALF foi realizada por Ramos e Silva (2017). Inicialmente os autores verificaram o melhor TDH (decrecido de 8 a 0,5 h) para produção de hidrogênio a partir de vinhaça e observaram os maiores valores de HY (1,64 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) em 4 h (60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). A TCO ótima verificada por Ramos e Silva (2017) foi bastante similar as TCOs ótimas para fermentação de vinhaça em outras configurações de reatores (Tabela 2). No acréscimo da temperatura em TDH fixo de 4 h foi observada redução da PVH de 8.640 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> em 55 °C para 6.960 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> em 65 °C e 192 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> em 75 °C. Além disso, foi observada redução do HY de 1,64 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> em 55 C para 1,29 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> em 65 °C e 0,04 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> em 75 °C. Os autores justificaram a redução da eficiência de produção de hidrogênio a redução da diversidade microbiana com o decréscimo da temperatura.

Niz et al. (2019) também realizaram produção de hidrogênio a partir de vinhaça sob condição hipertermofílica (70 °C), justificada pela temperatura em que a vinhaça sai do sistema de destilação (~90 °C). A maior PVH no AnSTBR dos autores (628 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) ocorreu em TDH de 19 h. Ao contrário da redução drástica de produção de hidrogênio observada por Ramos e Silva (2017) em 75 °C, Niz et al. (2019) apontaram que os resultados do AnSTBR hipertermofílico foram similares aos observados em reatores de leito fixo operados sob condição termofílica (Tabela 2) (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014, 2016; FUESS et al., 2016). Os



autores justificaram que a fermentação em condição hipertermofílica levam a crescimento disperso da biomassa devido a menor produção de exopolímeros em elevadas temperaturas. No caso da fermentação de vinhaça em reatores de leito fixo como APBR e AnSTBR, a produção de hidrogênio é beneficiada somente quando ocorre remoção da biomassa dentro do reator. Porém, o crescimento suspenso da biomassa levou à redução da PVH para  $480 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  ao reduzir o TDH para 8 h no AnSTBR devido à lavagem da biomassa do reator. Portanto, o crescimento disperso da biomassa em condição hipertermofílica, aliado ao elevado cisalhamento no RALF e baixo TDH aplicado (4 h) podem explicar o baixo HY em  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  no estudo de Ramos e Silva (2017), e não à redução da diversidade de microrganismos. Isto porque Niz et al. (2019) indicaram que a associação entre bactérias do gênero *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium* ocorreram em condição hipertermofílica, assim como acontecem em condição termofílica (LAMAISON et al., 2015).

A lavagem da biomassa suspensa também é evidenciada ao observar que a PVH máxima ocorreu em TDH de 19 h no AnSTBR hipertermofílico do estudo de Niz et al. (2019), enquanto em AnSTBR termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ( $2.074 \text{ NmL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) a PVH máxima ocorreu em TDH de 13,2 h (FUSS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019). Outro aspecto interessante do estudo de Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) da produção de hidrogênio a partir de vinhaça em AnSTBR termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) é sobre a importância do reator acidogênico na remoção de sulfato visando um possível reator subsequente no processo de produção de metano. Os autores apontaram que o reator acidogênico pode empregar um duplo papel: acidificação da vinhaça com geração de metabólitos e aumento da relação entre a matéria orgânica e o sulfato presente na vinhaça (relação DQO/sulfato), ambos desejáveis para a aplicação do efluente do reator acidogênico na produção de metano em reatores subsequentes.

Rego et al. (2020) realizaram pré-tratamento físico-químico para reduzir as concentrações de matéria orgânica e sulfato da vinhaça previamente a fermentação de  $5 \text{ g DQO L}^{-1}$  deste substrato em RALFs mesofílico ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As eficiências de remoção de matéria orgânica e sulfato da vinhaça foram de 19% e 22%, respectivamente. Os autores observaram que a produção de hidrogênio foi prejudicada em ambas as condições de temperatura e atribuíram os resultados à redução de sulfato em TDH superiores a 4 h (ao avaliar o decréscimo de 8 h para 1 h). Assim como observado ao comparar os estudos de Reis et al. (2015) e Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015b) da fermentação mesofílica de vinhaça com os estudos de Santos et al. (2014b) e Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015a) da fermentação termofílica de vinhaça, o reator termofílico de Rego et al. (2020) ( $1,06 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$ ) apresentou maior HY do que o reator mesofílico ( $0,27 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$ ). Porém, os autores

também apontaram que a acidificação do reator mesofílico (54,4% - 95,3%) foi significativamente superior à acidificação do reator termofílico (39,4% - 93,9%) em todos os TDHs aplicados.

A maior acidificação em reator mesofílico em relação ao reator termofílico foi relacionada a comunidade microbiana mais diversa em condição mesofílica (REGO et al., 2020). Isto porque a fermentação por cultura mista em condição mesofílica apresenta o sinergismo necessário para metabolizar um substrato tão complexo quanto a vinhaça. De fato, Eder et al. (2020) realizaram a fermentação mesofílica de vinhaça com *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* em co-cultura e com bioaugmentação de consórcio misto. Os autores observaram maior acidificação da vinhaça por consórcio misto em relação às culturas puras. A conversão de substrato observada em consórcio misto foi de 43%, enquanto os microrganismos sozinhos converteram apenas entre 29 – 39% do substrato. Os autores também atribuíram a maior conversão de carboidratos presentes na vinhaça ao maior sinergismo entre os microrganismos no consórcio misto.

A observação de maior acidificação em condição mesofílica estimularam Bernal, de Menezes e Silva (2021) a fermentar 10, 20 e 30 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça em 3 reatores de leito granular expandido (*expanded granular sludge bed*, EGSB) mantidos a 30 °C. Assim como Rego et al. (2020), Bernal, de Menezes e Silva (2021) indicaram que a acidificação dos reatores EGSB mesofílicos (54% - 76%) foram superiores à acidificação de vinhaça bruta em RALF termofílico (10%) e AnSTBR hipertermofílico (21%). Os autores ainda indicaram que a utilização de EGSB mesofílico possibilitou a aplicação de TCO tão elevada quanto 720 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Os valores de PVH máximos iguais a 4.360 e 8.770 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> foram observados para os reatores com 20 g DQO L<sup>-1</sup> e 30 g DQO L<sup>-1</sup> no menor TDH aplicado, ou seja, 1 h. Os valores de HY e PVH observados nos EGSB mesofílicos foram inferiores aos observados na fermentação termofílica de vinhaça em outras configurações de reatores (Tabela 2). Por outro lado, a recuperação de metabólitos líquidos foi apontada por Bernal, de Menezes e Silva (2021) como uma aplicação interessante de vinhaça.

A aplicação de vinhaça para obtenção de metabólitos líquidos a partir da fermentação primária é uma ótica recente que há muito era negligenciada, uma vez que, os metabólitos eram utilizados somente para inferir as rotas seguidas nos reatores (MORAES et al., 2019; FUESS et al., 2020; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021; SÁNCHEZ et al., 2021). Moraes et al. (2019) e Fuess et al. (2020) avaliaram o efeito do enriquecimento do consórcio microbiano por tratamento térmico e tratamento ácido na fermentação de vinhaça com foco em produção de HBu. Os autores indicaram que independente do pré-tratamento aplicado foi observado

sinergismo entre bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Clostridium*. Além disso, a partir da similaridade da composição dos metabólitos e diferença na comunidade microbiana os autores indicaram que ocorreu redundância funcional na fermentação de vinhaça. O sinergismo entre as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Clostridium* na fermentação de vinhaça leva ao alongamento de cadeia, com geração de H<sub>2</sub> e hidrogênio a partir de H<sub>2</sub>A.

A geração de H<sub>2</sub> e hidrogênio a partir de H<sub>2</sub>A na fermentação de vinhaça é reportada em ensaios em batelada (MORAES et al., 2019; FUESS et al., 2020; SÁNCHEZ et al., 2021), reatores contínuos (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019; REGO et al., 2020; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021), condição mesofílica (MORAES et al., 2019; FUESS et al., 2020; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021), condição termofílica (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019), e pH controlado nas faixas ácida e básica (SÁNCHEZ et al., 2021). Além disso, a ocorrência do alongamento de cadeia na fermentação de vinhaça é associada a condições de baixo TDH, elevada TCO e baixa carga de carboidratos (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021a; PIFFER et al., 2021). A ocorrência desta rota metabólica leva à geração de H<sub>2</sub> 3-vezes inferior ao observado na fermentação de carboidrato à HAc (PIFFER et al., 2021). Contudo, como a produção de hidrogênio a partir de H<sub>2</sub>A na fermentação de vinhaça ocorre em condições operacionais variadas, e não é impeditiva para a estabelecimento de condições sulfetogênicas no reator acidogênico (PIFFER et al., 2021), seu estabelecimento pode ser vantajoso para processos posteriores de produção de polihidroxicarboxilatos, foto-fermentação e produção de metano (BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021).

### 3.1.4 Digestão anaeróbia de vinhaça em dois estágios

A produção de hidrogênio e AGV em reator acidogênico seguida pela produção de metano em reator metanogênico subsequente tem sido aplicada com sucesso devido à possibilidade de regular os processos de acordo com a necessidade de cada grupo de microrganismos (SASIDHAR; KUMAR; XIAO, 2022). Os microrganismos produtores de hidrogênio apresentam taxa de crescimento máxima de 0,14 a 0,33 h<sup>-1</sup>, enquanto microrganismos metanogênicos apresentam taxa de crescimento de 0,017 h<sup>-1</sup> (LOVATO et al., 2020). Portanto, a reposição da biomassa acidogênica quando na lavagem do reator em aplicação de TDH reduzido tem velocidade aproximadamente 20 vezes superior à reposição da biomassa metanogênica, o que pode levar ao acúmulo de AGVs no reator. Neste caso, a fermentação primária da vinhaça em reator acidogênico pode ocorrer em TDHs tão baixos quanto 2 e 1 h (SANTOS et al., 2014b; REIS et al., 2015; REGO et al., 2020; BERNAL; DE

MENEZES; SILVA, 2021), enquanto a degradação do mesmo substrato ocorre em TDH de 23 a 96 horas (SOSA-VILLALOBOS et al., 2018; DE ALBUQUERQUE et al., 2019; RAMOS; SILVA, 2020; CAILLET; ADELARD, 2021).

A aplicação de TDHs reduzidos no reator acidogênico possibilita a utilização de configurações de reator com volumes reduzidos e, portanto, com menores custos de construção e dificuldade de operação. Além disso, a fermentação do resíduo em reator prévio pode resultar em redução do TDH também na unidade metanogênica, uma vez que, recebe alimentação parcialmente hidrolisada e acidificada (SASIDHAR; KUMAR; XIAO, 2022). A divisão do processo em dois estágios também pode permitir condições ácidas em reatores acidogênicos e condições neutras em reatores metanogênicos subsequentes. Isto porque a síntese de AGVs em rotas hidrogenogênicas é favorecida em pH 4,0 – 4,5 em fermentação tipo-EtOH, 4,8 – 5,2 e 5,8 – 6,5 em tipo-HBu, e 5,0 – 5,2 em tipo-acetato (REN et al., 2007). Por outro lado, a metanização da vinhaça é frequentemente conduzida em pH entre 7,0 – 8,5 (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016; SOSA-VILLALOBOS et al., 2018; DE ALBUQUERQUE et al., 2020; RAMOS; SILVA, 2020; CAILLET; ADELARD, 2021), uma vez que, arqueias metanogênicas acetoclásticas são sensíveis a pH inferiores a 6,5 e superiores a 8,5 (DE VRIEZE et al., 2012). A aplicação prática de diferentes faixas de pH na digestão em dois estágios é a possibilidade de fermentação primária sem adição de químicos e a redução de gastos com agentes tamponantes (FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2022)

Além da inibição da atividade de arqueias pelo pH, também é reportado que estes microrganismos são sensíveis a aplicação de temperaturas elevadas (>65 °C) (DE VRIEZE et al., 2012). O efeito adverso de aplicação de temperaturas elevadas na metanogênese pode ser atribuído à maior velocidade de síntese de ácidos (HUBER et al., 2020) e a desnaturação de proteínas nas células de alguns grupos de microrganismos (ELBESHBIHY et al., 2017). Porém, já foi previamente atestado que o melhor desempenho da fermentação primária de vinhaça é obtido em condições termofílicas em relação as mesofílicas (Tabela 2). Temperaturas elevadas também são responsáveis pelo aumento da taxa de hidrólise e da degradação de moléculas orgânicas (ROMERO-GÜIZA et al., 2021). Neste caso, a digestão de vinhaça em dois estágios (Tabela 3) também possibilita combinações de reatores acidogênico-metanogênico com temperaturas diferentes: termofílico-termofílico (BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016; FERRAZ JÚNIOR et al., 2016; RAMOS; SILVA, 2020; RAMOS et al., 2021), termofílico-mesofílico (RAMOS; SILVA, 2020; RAMOS et al., 2021), mesofílico-mesofílico (CABRERA-DÍAZ et al., 2017), hipertermofílico-termofílico (NIZ et al., 2021) e hipertermofílico-hipertermofílico (NIZ et al., 2021).

### 3.1.4.1 Sulfato

O sulfato pode compor a vinhaça de cana-de-açúcar devido à utilização de ácido sulfúrico em dois processos: na clarificação do açúcar e na prevenção da contaminação da levedura durante a produção de EtOH (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017). O sulfato na digestão anaeróbia está associado à competição de bactérias redutoras de sulfato (BRS) com as arqueias por substrato (HAc e H<sub>2</sub>), à desnaturação de proteínas por sulfeto, à precipitação de metais essenciais devido a presença de S<sup>2-</sup> e à corrosão das estruturas metálicas por sulfeto (FUESS; GARCIA, 2015). Os efeitos deletérios do sulfato se refletem também a produtividade de metano (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017; SANTOS et al., 2019). Kiyuna, Fuess e Zaiat (2017) avaliaram o efeito da relação entre matéria orgânica e sulfato (relação DQO/sulfato) na produção de metano e observaram redução de 35% na produtividade de metano em relação DQO/sulfato 7,5 relativamente à relação DQO/sulfato 12. Santos et al. (2019) verificaram se a composição de vinhaça afeta a produção de metano em bateladas mesofílicas e observaram influência da concentração de sulfato e da disponibilidade de matéria orgânica biodegradável. Os autores reportaram que relações DQO/sulfato inferiores à 11,85 favorecem o direcionamento do fluxo de elétrons para redução de sulfato.

Fuess, Zaiat e do Nascimento (2019) e Rego et al. (2020) apontaram a adoção do processo em dois estágios como alternativa para remoção do sulfato em reator acidogênico e, conseqüentemente, aumento da relação DQO/sulfato. Os autores indicaram que esta adoção pode não acarretar ganhos energéticos significativos por meio da produção de hidrogênio, mas poderia contribuir para maior produção de metano em reator subsequente. Silva et al. (2020a) avaliaram a influência de relações DQO/sulfato elevadas (50 - 94) e baixas (9 - 20) no tratamento de vinhaça em reator de membrana de dois estágios e verificaram que a atividade das bactérias redutoras de sulfato esteve intrinsecamente ligada a concentração de sulfato do reator. Em baixa relação DQO/sulfato os autores observaram competição entre arqueias e bactérias redutoras de sulfato, o que levou ao acréscimo de AGVs. Os autores também associaram a baixa relação DQO/sulfato à eliminação de substâncias poliméricas extracelulares e rompimento da parede celular dos microrganismos. Uma alternativa para contornar esses efeitos deletérios é a adição de substratos caracterizados por elevado conteúdo de carbono e baixa concentração de sulfato, o que configura a co-digestão (CABRERA-DÍAZ et al., 2017). A co-digestão não só elevaria a relação DQO/sulfato e reduziria a atividade de bactérias redutoras de sulfato mas também poderia aumentar a qualidade do biogás e balancear compostos inibitórios da vinhaça (RAMOS; SILVA, 2018).

Tabela 3. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Vinhaça em estágio único e em dois estágios

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	TDH (d)	pH	MY (N-mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
RALF	18,0	24,32	35	0,74	8,1	314	9,65	(BALAGUER; VICENT; PARÍS, 1992)
UASB	30,0	26,5	55	1,1	-	370 <sup>c</sup>	9,80	(SOUZA; FUZARO; POLEGATO, 1992)
RALF <sup>a</sup>	130	30,0	37	3,5	-	-	15,8	(ANDALIB et al., 2012)
RALF	20,07	26,19	30	1,0	6,5-8,3	295	5,37	(SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2013)
UASB	EA <sup>b</sup>	2,2	35	0,75		275	0,293	(BUITRÓN et al., 2014)
AnSBBR	4,0	4,41	30	-	7,3	225	0,84	(ALBANEZ et al., 2016a)

Tabela 3. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Vinhaça em estágio único e em dois estágios

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	TDH (d)	pH	MY (N·mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
UASB	35,0	25,0	55	1,42	8,3- 8,5	234	2,11	(FERRAZ JÚNIOR et al., 2016)
UASB	EA <sup>b</sup>	25,0	55	0,96	8,3- 8,5	306	2,80	
UASB	17,55	5,0-7,5	30	2,8	7,0- 7,5	181	0,60	(BARROS; DUDA; OLIVEIRA, 2016)
UASB	16,24	5,0-7,5	30	2,8	6,0- 7,0	185	0,83	
AnSBBR	7,0	8,18	35	-	7,2- 7,7	302	2,40	(ALMEIDA et al., 2017)
UASB	EA <sup>b</sup>	15,0	55	1,6	8,3	334	4,5	(FUESS et al., 2017)
AnSTBR	EA <sup>b</sup>	25,0	55	1,6	8,3	301	1,0	

Tabela 3. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Vinhaça em estágio único e em dois estágios

<b>Reator</b>	<b>Concentração</b> (g L <sup>-1</sup> )	<b>TCO</b> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>Temperatura</b> (°C)	<b>TDH</b> (d)	<b>pH</b>	<b>MY</b> (N-mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	<b>PVM</b> (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	<b>Referência</b>
UASB	28,0	28,0	55	1	7,8	240	3,32	(BARROS et al., 2017)
FVR	18,0	10,2	30	2	8,1	310	-	(AQUINO; FUESS; PIRES, 2017)
APBR	11,0	5,5	30	2	8,4	310	-	
UASB	5,75	12,5	35	2	8,1	289	2,57	(CABRERA-DÍAZ et al., 2017)
APBR	-	8,3		1,4		270	2,63	
UASB	34,9	30,0	22	0,86	-	266	8,63	(DEL NERY et al., 2018)
UASB	-	6,0	35	3	-	322	-	(SOSA-VILLALOBOS et al., 2018)



Tabela 3. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Vinhaça em estágio único e em dois estágios

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	TDH (d)	pH	MY (N·mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
APBR	EA	4,1	35	3,7		300	-	(TOLEDO-CERVANTES et al., 2018)
AnSBBR	20	25	55	0,8	8,5	407	7,89	(DE ALBUQUERQUE et al., 2019)
Batelada	5	-	37	-	-	334	0,29 <sup>d</sup>	(SANTOS et al., 2019)
RALF	7,5	7,5	55	1	7,1	300	3,78	(RAMOS; SILVA, 2020)
RALF	EA	21,6	55	0,42	8,2	260	5,57	
AnMBR	EA	4,6 – 8,8	22	2,58	7,0	-	-	(SILVA et al., 2020a)
Batelada	5,5	-	- <sup>e</sup>	-	6,8-7,2	37	-	(ILTCHENCO et al., 2020)
UASB	41,2	2,75	38	15	4,5	250	0,54 <sup>d</sup>	(SICA et al., 2020)

Tabela 3. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Vinhaça em estágio único e em dois estágios

Reator	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	TDH (d)	pH	MY (N·mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
Semi-contínuo	9	2,26	37	4	7,5	179	0,34 <sup>d</sup>	(CAILLET; ADELARD, 2021)
AnSTBR	32,7	5	70	4,8	8,4	158	0,3	(NIZ et al., 2021)
	EA	5	70	4,1	8,4	31 <sup>f</sup>	0,2	
	5	5	55	1	8,1	280	1,1	
RALF	EA	13,3	55	0,75	8,2	240	2,7	(RAMOS et al., 2021)
	EA	24,7	30	0,75	8,0	240	3,2	

APBR: *anaerobic packed bed reactor*, reator de leito empacotado; AnMBR: *anaerobic membrane bioreactor*, reator anaeróbio com membrana; AnSBBR: *anaerobic sequencing batch biofilm reactor*, bateladas sequenciais ; AnSTBR: *anaerobic structured bed reactor*, reator anaeróbio de leito estruturado; FVR: reator de leito estruturado; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado; UASB: *upflow anaerobic sludge blanket*, reator de fluxo ascendente e manta de lodo; <sup>a</sup>: vinhaça de milho; <sup>b</sup>: EA, alimentado com efluente de reator acidogênico; <sup>c</sup>: MY (mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) em 55 °C; <sup>d</sup>: calculado com base nos dados do originais do artigo; <sup>e</sup>: ensaio mesofílico; <sup>f</sup>: mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>.

### 3.2 CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA

Existem pesquisas significativas sobre o processo de co-digestão, digestão anaeróbia de dois ou mais substratos. Na Figura 4 pode ser observado o aumento do número de publicações de artigos científicos em periódicos de alto impacto que dissertaram sobre o processo de co-digestão. As principais vantagens desse processo incluem: (i) melhorias na estabilização do sistema; (ii) diluição de substâncias inibitórias; (iii) balanço nutricional; (iv) efeito sinérgico dos microrganismos; (v) aumento da biodegradabilidade da matéria orgânica; e (vi) compartilhamento do mesmo aparato para tratamento de mais de uma água residuária (HAGOS et al., 2017; SIDDIQUE; WAHID, 2018).

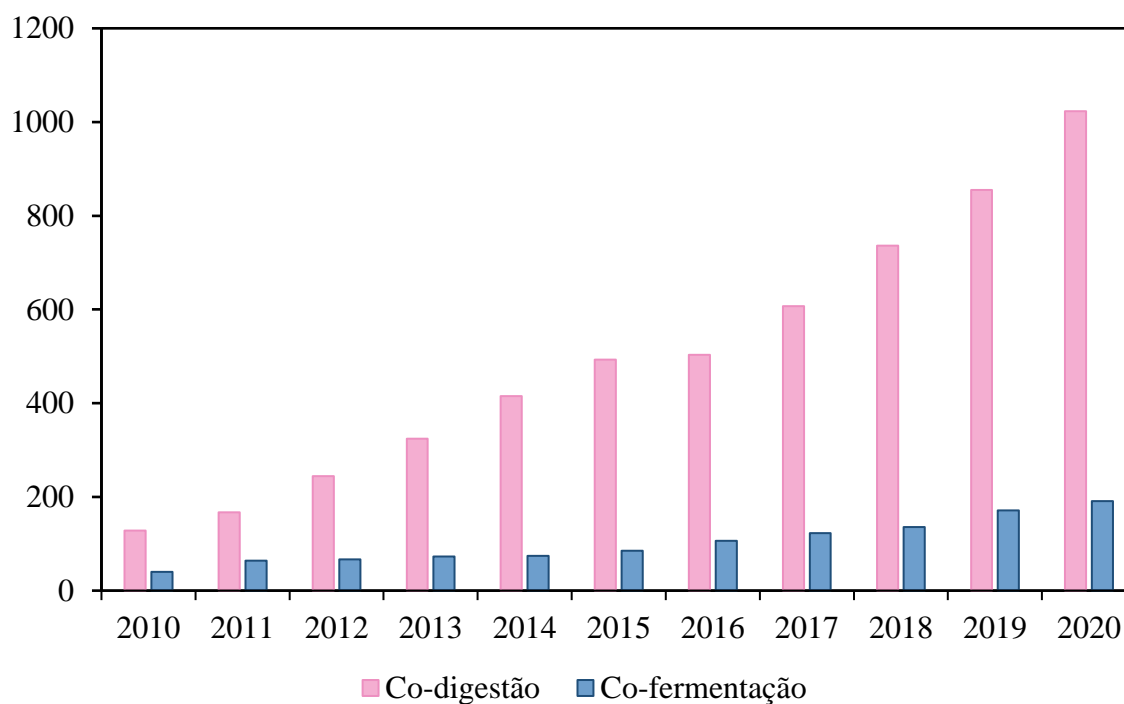


Figura 4. Número de artigos publicados de 2010 - 2020 que contém os “co-digestion” (co-digestão) e “co-fermentation” (co-fermentação) nas palavras-chave, título ou resumo

(Fonte: wcs.webofknowledge.com)

#### 3.2.1 Co-digestão de vinhaça

Alguns destes estudos demonstram o aumento das produções de hidrogênio e metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar quando co-digerida com melaço (ALBANEZ et al., 2018), soro de queijo (RAMOS; SILVA, 2018; LOVATO et al., 2019b) e glicerol (LOVATO et al.,

2019a). No estudo de Lovato et al. (2019a) foi avaliado o efeito da proporção de cossubstratos (100%, 67%, 50%, 33% e 0% de glicerina), da TCO (5; 7,5 e 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e da temperatura (30 °C e 35 °C) na produção de metano a partir da co-digestão de glicerina e vinhaça de cana-de-açúcar. Os autores observaram que a adição de glicerina foi benéfica à digestão de vinhaça, com MY máximo de 15,30 mol CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> para proporção de 50%, TCO de 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C.

### 3.3 A GLICERINA COMO CURINGA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Para melhor entendimento da escolha de utilização da glicerina como cossustrato para produção de hidrogênio e metano em processos anaeróbios é necessário conhecer a origem e geração deste subproduto. Também é importante avaliar as peculiaridades da fermentação e digestão desse substrato em processos anaeróbios.

#### 3.3.1 Produção de biodiesel

O Brasil é um país com intensa prática de agricultura e pecuária com fontes variadas de gordura animal e óleos vegetais (óleo de algodão, óleo de soja, óleo de girassol) que podem ser utilizados na produção de biodiesel. Por este motivo, o país é atualmente um dos maiores produtores de biodiesel do mundo (5,9 bilhões de litros em 2019) ao lado de Indonésia (7,9 bilhões de litros), Estados Unidos (6,5 bilhões de litros), Alemanha (3,8 bilhões de litros), França (3 bilhões de litros) e Argentina (2,5 bilhões de litros) (STATISTA, 2020). Além disso, a legislação brasileira por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) prevê o aumento do percentual de biodiesel incorporado ao diesel. Então, com aumento de 5% em 2010 para 13% em 2021 do biodiesel no diesel fóssil, a sua produção foi proporcionalmente crescente ao longo da última década (Figura 5).

A produção de biodiesel é comumente realizada por transesterificação, na qual, o óleo animal ou vegetal (triglicerídeo) reage com um álcool e forma o biodiesel (fase leve) e o glicerol (fase pesada). Estima-se que 10% da massa total de biodiesel é correspondente à massa gerada de glicerol (Figura 5) (CROSSE et al., 2020). O biodiesel formado é uma mistura de ésteres metílico ou etílico, a depender do álcool utilizado na reação (MeOH ou EtOH). Também são utilizados catalisadores, como os hidróxidos de potássio e sódio. Os produtos formados (biodiesel e glicerol) são submetidos a centrifugação/decantação para separação. Posteriormente o biodiesel é encaminhado para purificação, na qual o álcool é removido e

retornado ao processo (RODRIGUES; BORDADO; DOS SANTOS, 2017; CROSSE et al., 2020). O glicerol também passa por um posterior processo de destilação visando recuperar o álcool reutilizado na transesterificação. Contudo, o MeOH e os sais da reação permanecem no glicerol como contaminantes, e por isso, o glicerol resultante da transesterificação é denominado glicerol bruto (GB) (CROSSE et al., 2020).

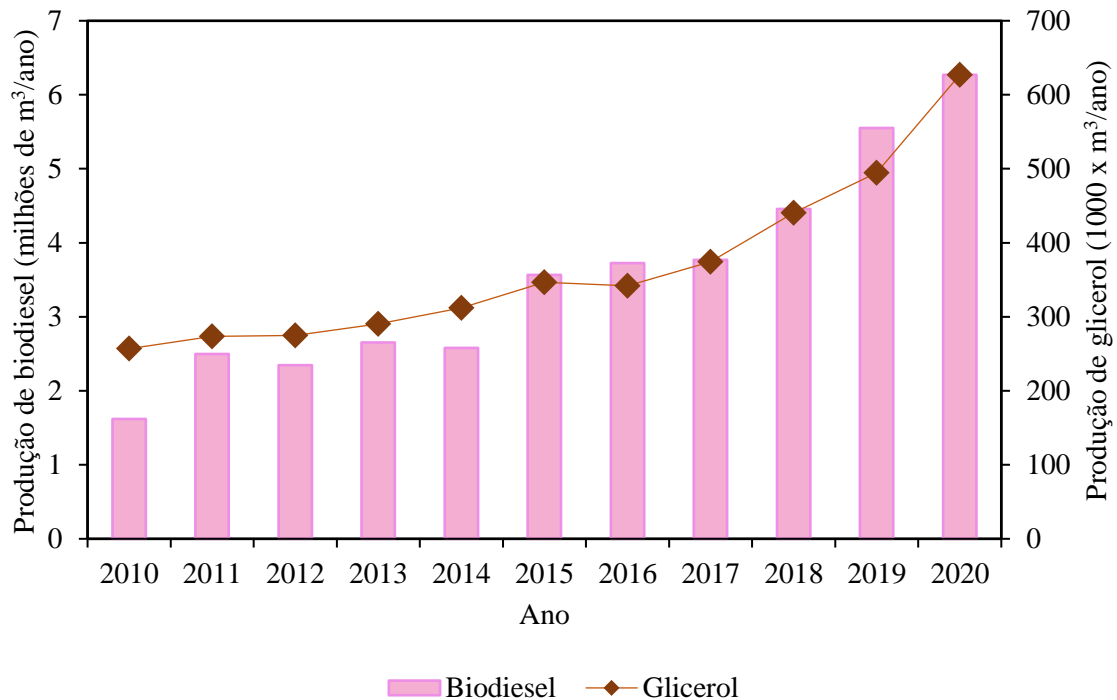


Figura 5. Produções anuais de biodiesel e glicerina de 2010-2020

(Fonte: adaptado da ANP, 2021)

### 3.3.2 Glicerol residual

O glicerol residual (GR) apresenta MeOH/EtOH, sabões e sais em sua composição. Por outro lado, o subproduto da produção de biodiesel também apresenta elevado percentual de glicerina ou glicerol ( $> 62\% \text{ m m}^{-1}$ ). Na forma pura o glicerol (1,2,3-propanotriol) é viscoso, incolor, inodoro, higroscópico, atóxico e solúvel em álcool e água (HARON et al., 2018). Então, a glicerina pura (GP), ou glicerol purificado, pode ser utilizado nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica (CROSSE et al., 2020). Enquanto o preço de mercado do GR é de aproximadamente U\$ 0,17 por quilo (RUY et al., 2020), o preço da GP é cinco vezes mais elevado devido aos custos de purificação (MONTEIRO et al., 2018). Contudo, o aumento crescente da disponibilidade do glicerol atrelado aos elevados custos de purificação faz com

que sua absorção pelo mercado seja dificultada (RUY et al., 2020). Neste contexto, é crescente a preocupação com o desenvolvimento de alternativas para utilização do GR de forma a aumentar a sustentabilidade da geração de biodiesel (MONTEIRO et al., 2018). Dentre estas alternativas há um destaque para a digestão anaeróbia devido à possibilidade de se recuperar mais de um composto de valor agregado como hidrogênio (RODRIGUES et al., 2016; TRCHOUNIAN; POLADYAN; TRCHOUNIAN, 2016; AGUILAR-AGUILAR et al., 2019; GARCÍA; CAMMAROTA, 2019), 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (PARANHOS; SILVA, 2020; SILVA et al., 2021), HPr (NAZARETH et al., 2018; PARANHOS; SILVA, 2020), ácido valérico (HVa) (VERAS et al., 2020), EtOH (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017) e metano (HUTŇAN; KOLESÁROVÁ; BODÍK, 2013; DOUNAVIS et al., 2016; HE; MCNUTT; YANG, 2017) a partir do glicerol não-purificado.

### 3.3.3 Utilização do glicerol por microrganismos

O glicerol pode ser metabolizado por microrganismos dos gêneros *Clostridium* (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012; RODRIGUES et al., 2016; YAMANE; KOMIYAMA, 2017; PACHAPUR et al., 2017), *Klebsiella* (CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2014; YANG et al., 2018), *Lactobacillus* (STEVENS et al., 2011; DE SANTANA et al., 2021), e *Enterobacter* (ITO et al., 2005; REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013). O glicerol entra por difusão nas células e é metabolizado sem necessidade de hidrólise (MEIER et al., 2020a). Já os lipídios do GR são hidrolisados em glicerol e ácidos graxos de cadeia longa previamente à fermentação primária. Na etapa de fermentação primária, os microrganismos metabolizam o glicerol em vias redutivas e oxidativas (Figura 6) (XIU et al., 2007). A energia produzida na via oxidativa durante a fermentação do glicerol em ácidos acético, butírico, succínico e láctico é gasta no crescimento celular (ZHU et al., 2021). Os NADH formados na via oxidativa são aplicados na biossíntese de 1,3-PDO na via redutiva (ZHU et al., 2021). Por outro lado, quando ocorre a produção de metano o equilíbrio tende a ser deslocado para produção de ácidos (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021), uma vez que, o HAc é utilizado por arqueias metanogênicas acetoclásticas. Além disso, o hidrogênio gerado na conversão de glicerol a HAc, H<sub>2</sub>Bu, H<sub>2</sub>La e EtOH é utilizado por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. Então, na geração de metano a fermentação primária não tende a ir para geração de 1,3-PDO (ZHU et al., 2021).

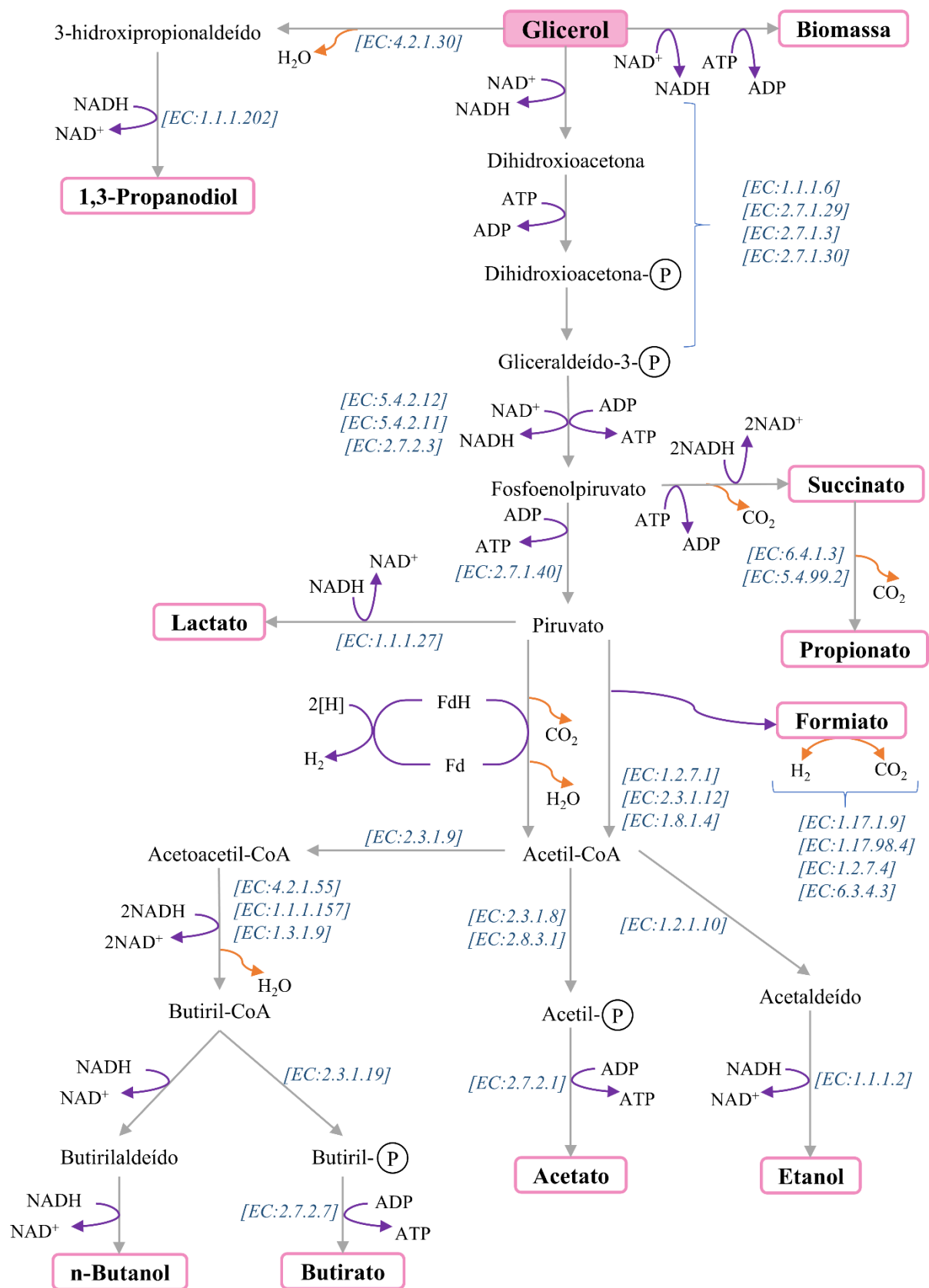


Figura 6. Possíveis rotas da fermentação primária de glicerol  
(Entre colchetes estão os números de comissão de enzima para os principais KO)

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de variação de energia livre ( $\Delta G^0$ ) das principais reações que ocorrem na digestão de glicerol. Como foi previamente mencionado, quando o objetivo é a produção de metano, a geração de 1,3-PDO tende a não ocorrer e o hidrogênio produzido pela via oxidativa é consumido. Então, se o objetivo é obter produtos da fermentação primária do glicerol (Equações 3.9 – 3.14), as arqueias metanogênicas devem ser eliminadas por tratamentos físicos (tratamento térmico, TDH, pH) e/ou químicos (ácidos e bases) (GARCÍA; CAMMAROTA, 2019; TOLEDO-ALARCÓN et al., 2020; DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021). Por outro lado, a obtenção de cada metabólito a partir da fermentação primária (em especial hidrogênio e 1,3-PDO) deve ser regulada pelo ajuste de condições operacionais como: tipo de inóculo, configuração de reator, temperatura, pH, TDH e concentração de glicerol.

### *3.3.3.1 Fermentação escura para produção de $H_2$*

O HY máximo a partir da fermentação de glicerol é obtido quando todo substrato é direcionado para via de produção de HAc ( $3 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$ ), na qual também a produção de energia é maximizada (Equação 3.10). A produção de HBU tem um saldo de  $2 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$  (Equação 3.12), enquanto o direcionamento do substrato para produção de HLa (Equação 3.14) e EtOH (Equação 3.13) apresenta um saldo de  $1 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$ . Diferentemente da geração de HPr a partir de glicose, a produção deste ácido a partir de glicerol não leva a consumo de hidrogênio (Equação 3.2). Todavia, a geração de HPr a partir de glicerol é facilitada por ambos apresentarem o mesmo grau de redução (4.67) (NAZARETH et al., 2018). Então, no que diz respeito à maximização da produção de hidrogênio, a geração de HPr deve ser evitada pois configura competição por substrato.

Os estudos de produção de hidrogênio a partir de glicerol foram majoritariamente desenvolvidos em ensaios descontínuos (Tabela 5), e utilizando cultura pura (ITO et al., 2005; NGO; KIM; SIM, 2011; REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013; CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2014; SARMA; DUBEY; MOHOLKAR, 2016). Os objetivos destes estudos foram determinar as melhores condições de pH, meio nutricional, e fonte inóculo na fermentação deste substrato. Poucos estudos foram conduzidos em ensaios contínuos (LO et al., 2013; SILVA-ILLANES et al., 2017; TOLEDO-ALARCÓN et al., 2020), e uma quantidade menor ainda foi desenvolvida objetivando o ajuste de condições operacionais para produção contínua de hidrogênio em reatores de alta taxa (REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013; DOUNAVIS; NTAIKOU; LYBERATOS, 2015; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017,



2020a; NAZARETH et al., 2018; PARANHOS; SILVA, 2020). Também é possível observar uma lacuna na investigação da produção de hidrogênio a partir de glicerol sob condição termofílica (NGO; KIM; SIM, 2011; MARU et al., 2012; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012, 2020a). Além disso, é válido mencionar que apenas Sittijunda e Reungsang (2020) e Simões et al. (2021) realizaram a fermentação termofílica de glicerol em reator contínuo utilizando cultura mista.

No que se refere à composição do glicerol, Ito et al. (2005) compararam GR e GP na produção de hidrogênio por *Enterobacter aerogenes* isolada de lodo metanogênico em ensaios batelada sob condições mesofílicas (37 °C). Foram aplicadas as concentrações iguais a 1,7 g L<sup>-1</sup>, 3,3 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 25 g L<sup>-1</sup> para o GR e 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 25 g L<sup>-1</sup> para a GP. Os HY máximos de 1,12 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol e 1,05 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol foram observados ao aplicar 1,7 g L<sup>-1</sup> e 5 g L<sup>-1</sup> de GR e GP, respectivamente. O EtOH foi o metabólito predominante na fermentação dos dois substratos. Foi observado decréscimo do rendimento de produção de EtOH de 0,96 mol EtOH mol<sup>-1</sup> glicerol para 0,56 mol EtOH mol<sup>-1</sup> glicerol ao aumentar a concentração de GR de 1,7 g L<sup>-1</sup> para 25 g L<sup>-1</sup> e de 1,00 mol EtOH mol<sup>-1</sup> glicerol para 0,80 mol EtOH mol<sup>-1</sup> glicerol ao aumentar a concentração de GP de 5 g L<sup>-1</sup> para 25 g L<sup>-1</sup>. Os autores também avaliaram a produção de H<sub>2</sub> em PBR (37 °C) e observaram que para o PBR contendo células auto imobilizadas a PVH foi de 30 mmol h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> no reator alimentado com GR (10 g L<sup>-1</sup>) e 80 mmol h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> no reator alimentado com GP (10 g L<sup>-1</sup>). Os autores atribuíram o melhor desempenho do PBR alimentado com GP em relação ao PBR alimentado com GR às impurezas do deste último. O cloreto de sódio, por exemplo, é uma impureza do GR que pode ser inibitório ao crescimento celular. Ao utilizar PBR com material suporte para imobilização da biomassa, os autores observaram PVH de 63 mmol h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> para o GR, superior à PVH observada para o mesmo substrato ao utilizar PBR com células automobilizadas. Os resultados dos autores indicam que a redução da produtividade de hidrogênio devido à perda de biomassa, por inibição do crescimento celular devido aos contaminantes do GR e à lavagem da biomassa, podem ser atenuados pela utilização de meio suporte.

Tabela 4. Reações e variação da energia livre da digestão anaeróbia do glicerol em diferentes temperaturas

Reação	$\Delta G_{T-25^{\circ}\text{C}}$	$\Delta G_{T-55^{\circ}\text{C}}$	$\Delta G_{T-60^{\circ}\text{C}}$	$\Delta G_{T-65^{\circ}\text{C}}$	Equação
	(kJ mol <sup>-1</sup> )				
Glicerol + H <sub>2</sub> → 1,3-Propanodiol + H <sub>2</sub> O	-75.7	-75.7	-75.7	-75.7	(3.9)
Glicerol + 2H <sub>2</sub> O → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2H <sup>+</sup> + 3H <sub>2</sub>	-47.1	-52.5	-53.4	-54.3	(3.10)
Glicerol + H <sub>2</sub> O → Propionato <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	-136.6	-139.3	-139.8	-140.2	(3.11)
Glicerol + H <sub>2</sub> O → 0.5HBU <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 1.5H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	-77.7	-81.8	-82.5	-83.1	(3.12)
Glicerol + H <sub>2</sub> O → Etanol + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	-69.8	-72.5	-73.0	-73.4	(3.13)
Glicerol → Lactato <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub>	-55.4	-58.1	-58.6	-59.0	(3.14)

Nota: os cálculos de variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foram determinados de acordo com os parâmetros descritos por Kleerebezem; Van Loosdrecht, (2010). Os cálculos para cada temperatura de operação foram realizados considerando pH 4,7.

Tabela 5. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de Glicerol Residual e Glicerina

Reator	Substrato	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	Faixa de pH pH	pH ótimo	HY (mol H <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> <sub>glicérol</sub> )	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
Batelada	GP	5,0			-			1,05	-	
	GR	1,7	37	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	6,8		1,12	-	(ITO et al., 2005)
PBR	GP	10,0			-			-	80 <sup>a</sup>	
	GR	10,0			-			-	30 <sup>a</sup>	
Batelada	GP	3,0	30	Cultura mista	-	6,2		0,28	-	(SELEMBO et al., 2009)
	GR	3,0			-			0,30	-	
Batelada	GR	5,0	75	<i>Thermotoga neapolitana</i>	-	7,5		1,28	-	(NGO; KIM; SIM, 2011)
Batelada	GR	2,5	37	Cultura mista	-	5,0-8,0	6,5	0,70	-	(MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012)
Batelada	GR	2,5	80	Cultura mista	-	5,0-8,5	6,5-7,5	2,66	-	(MARU et al., 2012)
Batelada	GR	25	55	Cultura mista	-	4,0-8,0	5,5	-	1.079 <sup>b</sup>	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012)

Tabela 5. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de Glicerol Residual e Glicerina

Reator	Substrato	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	Faixa de pH	pH ótimo	HY (mol H <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> glicerol)	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
Batelada	GR			Cultura mista	-	5,0-9,0	7,0	0,93	-	
CSTR	GR	10	35	Cultura mista		-	-	0,77	3.984	(LO et al., 2013)
CSTR	GP			Cultura mista	12	-	-	0,50	2.474	
UASB	GR			<i>Enterobacter aerogenes</i>				0,32	6,2	(REUNGSANG; SITTIJUNDA; O- THONG, 2013)
UASB	GP	30,0	37		26	5,5	-	0,41	9,0 <sup>a</sup>	
UASB	GR	10,0	40	<i>Klebsiella</i> sp.	4	8,0	-	44,27 <sup>c</sup>	6,9 <sup>a</sup>	(CHOOKAEW; O- THONG; PRASERTSAN, 2014)
UCB	GR	25,0	35	Cultura mista	24	6,0-7,0	7,0	0,55	4.230	(DOUNAVIS; NTAIKOU; LYBERATOS, 2015)
Batelada	GP	0,7	35	Cultura mista	-	4,8-8,2	5,5	2,45	-	(FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016)

Tabela 5. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de Glicerol Residual e Glicerina

Reator	Substrato	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	Faixa de pH	pH ótimo	HY (mol H <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> glicerol)	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
Batelada	GR	10,0	37	Cultura mista	-	5,5	-	2,20	-	(RODRIGUES et al., 2016)
Batelada	GR	7,4	36,18	<i>Clostridium pasteurianum</i>	-	5,0-8,0	6,7	0,63	-	(SARMA; DUBEY; MOHOLKAR, 2016)
CSTR	GR	10,0	37	Cultura mista	12	5,0-6,5	5,5	0,58	2,5 <sup>a</sup>	(SILVA-ILLANES et al., 2017)
UASB	GR	25,0	37	Cultura mista	12	5,5	-	0,37	3,3	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017)
	GP				12		-	0,58	6,0 <sup>a</sup>	
UASB	GR	-	-	Cultura mista	-	5,2	-	0,08	-	(VASCONCELOS et al., 2019)
Batelada	GR	16,0	37	Líquido ruminal	-	8,1	-	0,21	-	(VIANA et al., 2019)
Batelada	GR	50,0	30	Cultura mista	-	4,0-5,5	5,5	24,5 <sup>d</sup>	-	(GARCÍA; CAMMAROTA, 2019)
Batelada	GR	20,0	37	Cultura mista	-	5,5	-	0,80	-	(RODRIGUES et al., 2019)

Tabela 5. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de hidrogênio a partir de Glicerol Residual e Glicerina

Reator	Substrato	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Inóculo	TDH (h)	Faixa de pH pH	pH ótimo	HY (mol H <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> glicerol)	PVH (mL H <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
CSTR	GP	15	37	Cultura mista	12	6,5	6,5	0,40	1.186	(PAILLET et al., 2019)
CSTR	GR	10	35	Cultura mista	24	5,5-6,0	-	0,25	350	(SILVA et al., 2020b)
CSTR	GP	7,5	37	Lodo aeróbio	12	5,5	-	0,55	-	(TOLEDO-ALARCÓN et al., 2020)
RALF	GR	18	30	Cultura mista	7,72	4,5	-	0,31	-	(PARANHOS; SILVA, 2020)
UASB	GP	25	55	Cultura mista	9,6	5,5	-	2,90	78 <sup>a</sup>	(SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a)
Batelada	GP	5	36	Cultura mista	-	7,0	-	0,52	-	(CHEN; YIN; WANG, 2021)
RALF	GR	10	55	Cultura mista	1	5,0	-	1,20	35.040	(SIMÕES et al., 2021)

CSTR: *continuous stirred tank reactor*, reator tanque agitado contínuo; GP: GP; GR: glicerol residual; PBR: *packed bed reactor*, reator de leito empacotado; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado; UASB: *upflow anaerobic sludge blanket reactor*, reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo; UCB: *upflow column bioreactor*, reator em coluna com fluxo ascendente; a: mmol H<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>; b: mL H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>; c: mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> glicerol; d: mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>.

Selembo et al. (2009) utilizaram GP e GR (contendo 69,5% de glicerina) como substratos para produção de hidrogênio em ensaios batelada com culturas mistas sob condição mesofílica (30 °C). Os autores compararam quatro tipos de inóculos: solo de plantação de tomates, solo de plantação de trigo, lodo desaguado e lodo proveniente de digestor, todos submetidos à pré-tratamento térmico. Apesar de relatarem os mesmos compostos inibitórios no GR previamente reportados por Ito et al. (2005), os autores observaram HY similares nos ensaios realizados com 3 g L<sup>-1</sup> de GR (0,30 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) e 3 g L<sup>-1</sup> de GP (0,28 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) ao utilizarem solo de plantação de trigo. O metabólito líquido predominante na fermentação de GR foi 1,3-PDO com rendimento de 1,3-PDO (Y<sub>1,3-PDO</sub>) igual a 0,59 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol. Então, diferentemente do apontado por Ito et al. (2005) o HY foi decrescido devido ao redirecionamento do glicerol para via redutiva e não devido aos contaminantes presentes no glicerol.

Para evitar a inibição das bactérias pelo cloreto de sódio no GR, Ngo, Kim e Sim (2011) realizaram pré-tratamento do glicerol por evaporação (45 °C) previamente a aplicação deste substrato na produção de hidrogênio por *Thermotoga neapolitana* em ensaios batelada termofílicos (75 °C). O HY para os ensaios com GR pré-tratado (5 g L<sup>-1</sup>) foi de 1,97 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, enquanto o HY para o GR não tratado (5 g L<sup>-1</sup>) foi de 1,27 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol. Para comparar o desempenho da fermentação de GR os autores realizaram ensaio com GP. Na fermentação de GP foi observado HY de 1,02 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, inferior ao HY dos ensaios em que foram utilizados GR pré-tratado e GR não tratado. Portanto, apesar de inibitório em elevadas concentrações o cloreto de sódio pode ter efeito positivo no desenvolvimento das bactérias produtoras de hidrogênio. Os autores também avaliaram o efeito da aspensão de nitrogênio e do controle de pH na produção de hidrogênio a partir de GR e observaram que o HY do ensaio em que foi aspergido N<sub>2</sub> (2,06 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) foi superior ao HY do ensaio sem aspensão de N<sub>2</sub> (1,24 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol). O efeito benéfico da aspensão de nitrogênio confirma que a produção de hidrogênio a partir de glicerol não é inibida somente pela composição do substrato, mas também pelo aumento da pressão parcial de hidrogênio.

Outro parâmetro operacional com grande influência na fermentação de glicerol é o pH. Isto porque o glicerol é facilmente biodegradável e leva ao rápido acúmulo de AGV e redução do pH. Por sua vez, os microrganismos dispendem maior energia para manutenção do pH intracelular em 7,0 (BUNDHOO; MOHEE, 2016). Contudo, como a geração de ATP depende da formação de AGV pela via oxidativa, a redução do pH leva a alteração das rotas metabólicas no sistema. Geralmente, para se gerar ATP ao mesmo tempo em que não ocorre um aumento

ainda maior na concentração de AGV os microrganismos tendem a produzir álcoois, como o EtOH. A redução do pH também está associada a outras alterações nas funções metabólicas intracelulares, como a atividade de hidrogenase (ELBESHBISHY et al., 2017). Mangayil, Karp e Santala (2012) avaliaram o efeito do pH (5,0 a 8,0) na produção de hidrogênio a partir de GR (2,5 g L<sup>-1</sup>) em ensaios batelada mesofílicos (37 °C) com cultura mista. O HY máximo de 0,7 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol observado em pH 6,5 foi coincidente com a maior conversão de glicerol (36,7%) e identificação de EtOH e H<sub>2</sub>Bu como metabólitos predominantes na fase líquida. Os baixos valores de HY observados pelos autores em relação ao teórico máximo (3 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) ocorreram porque a conversão de acetil-CoA a acetaldeído e a conversão de acetaldeído para EtOH já fazem por si só a regeneração de NAD<sup>+</sup>, e reduzem o saldo da produção de hidrogênio.

Maru et al. (2012) também avaliaram o efeito do pH (5,0 a 8,5), do inóculo (*Thermotoga maritima* e *Thermotoga neapolitana*) e da adição de extrato de levedura (0 – 4 g L<sup>-1</sup>) na produção de hidrogênio a partir de 2,5g L<sup>-1</sup> de glicerol sob condição hipertermofílica (80 °C). Os autores observaram elevada taxa de crescimento para pH entre 6,5 e 7,5 e baixa taxa de crescimento em pH abaixo de 5,0 e acima de 8,0. Baixas concentrações de extrato de levedura resultaram em baixo consumo de glicerol e baixa produção de hidrogênio. Para a concentração de extrato de levedura igual a 4 g L<sup>-1</sup> não foi observado aumento do HY (2,66 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) em relação ao HY do teste em que foi aplicada concentração de extrato de levedura igual a 2 g L<sup>-1</sup> (2,65 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol). Portanto, além da inibição do crescimento de microrganismos em pH reduzido (<5,0) devido ao gasto energético para manutenção do pH intracelular, a fermentação de glicerol em meio básico (pH > 8,0) não favorece a produção de hidrogênio.

Sittijunda e Reungsang (2012) avaliaram o efeito das variáveis pH (4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; e 8,0), concentração de ureia (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 g L<sup>-1</sup>), temperatura (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C e 70 °C), concentração de glicerol (20 g L<sup>-1</sup>, 25 g L<sup>-1</sup>, 50 g L<sup>-1</sup>, 100 g L<sup>-1</sup> e 150 g L<sup>-1</sup>) e concentração de fosfato de sódio dibásico (1,0 g L<sup>-1</sup>, 2,0 g L<sup>-1</sup>, 5,0 g L<sup>-1</sup> e 7,0 g L<sup>-1</sup>) na produção de hidrogênio a partir de GP por cultura mista. O ensaio em pH 5,5, concentração de ureia igual a 0,2 g L<sup>-1</sup>, concentração de glicerol igual a 25 g L<sup>-1</sup>, concentração de fosfato de sódio dibásico igual a 2 g L<sup>-1</sup> e temperatura em 55 °C apresentou produção máxima de hidrogênio igual a 1078,79 mL H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Ao otimizarem as condições fermentativas para produção de hidrogênio a partir de GP por meio de planejamento estatístico de experimentos, os autores observaram produção máxima de 1502,84 mL H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> para 20,33 g L<sup>-1</sup> de GR, 0,16 g L<sup>-1</sup> de uréia, 3,97 g L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio dibásico e 0,20 mL L<sup>-1</sup> de meio Endo (ENDO;



NOIKE; MATSUMOTO, 1982). O metabólito líquido predominante na fermentação de GR por culturas mistas foi o 1,3-PDO ( $5,81 \text{ g L}^{-1}$ ) para concentração de GR igual à  $23,41 \text{ g L}^{-1}$ .

Lo et al. (2013) avaliaram o efeito do pH (5,0 a 9,0), da concentração de GR ( $1 - 40 \text{ g L}^{-1}$ ) e da temperatura na produção de hidrogênio por cultura mista. Diferentemente de Sittijunda e Reungsang (2012) que realizaram testes para temperatura variando de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , Lo et al. (2013) realizaram testes sob condições mesofílica e termofílica ( $30 \text{ }^\circ\text{C} - 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e observaram que as melhores condições para produção de hidrogênio a partir de GR foram  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 7,0. O HY de  $0,93 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$  glicerol foi atribuído a predominâncias de *Clostridium pasteurianum* e *Klebsiella* sp. Os metabólitos foram compostos majoritariamente de EtOH, BuOH e 1,3-PDO. Foi observada ausência de  $\text{H}_2$  em pH abaixo de 5,0 e acima de 9,0 em testes realizados em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . A melhor concentração de GR para produção de  $\text{H}_2$  foi  $10 \text{ g L}^{-1}$ , na qual foi observado  $\% \text{H}_2$  de 57%. Ao realizar testes em CSTR mesofílico ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de GP os autores observaram  $\% \text{H}_2$  de 78,3%, PVH de  $2.474,4 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e HY de  $0,50 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$  glicerol. Já nos testes com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de GR foi observado  $\% \text{H}_2$  de 72,7%, PVH de  $3.984 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e HY de  $0,77 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$  glicerol. Os HY superior do CSTR alimentado com GR em relação ao CSTR alimentado com GP foi atribuído ao fosfato presente no GR, oriundo do processo de separação do glicerol do biodiesel.

Maru et al. (2013) avaliaram o efeito do pH (4,9 a 9,2) e da adição de extrato de levedura ( $0 - 4 \text{ g L}^{-1}$ ) na produção de hidrogênio a partir de glicerol ( $2,5 - 40,0 \text{ g L}^{-1}$ ) em ensaios em batelada com *Thermotoga maritima* sob condição hipertemofílica ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os autores observaram que em pH abaixo de 6,0 e acima de 8,0 ocorreu decréscimo considerável da produção de hidrogênio, e então apontaram que a conversão de glicerol não é limitada pela concentração de glicerol, mas pelas condições operacionais. Similarmente ao apontado por Maru et al. (2012), não foi observado acréscimo da produção de hidrogênio com a adição de concentrações de extrato de levedura superiores à  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ . Contudo, a adição de  $0,5 - 1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura foi benéfica à produção de hidrogênio. O HY máximo de  $2,84 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$  glicerol em pH 7,0 – 7,5 foi coincidente com a relação estequiométrica de 1 mol de acetato: 1 mol  $\text{CO}_2$ : 1 mol de  $\text{H}_2$ , indicando que o HY observado pelos autores (próximo ao teórico) foi corroborado pela produção majoritária de HAc na fase líquida.

Reungsang, Sittijunda e O-Thong (2013) utilizaram reator UASB mesofílico ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) inoculado com *Enterobacter aerogenes* isolada de grânulos termicamente pré-tratados para produção de hidrogênio a partir de GP e GR em pH 5,5. Inicialmente o reator UASB foi operado com GP em TCO acrescida de 25,0 para 37,5; 50,0; 62,5 e  $75,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Após observar a TCO ótima para produção de hidrogênio a partir de GP foi adicionado GR como substrato em

TCO acrescidas de  $37,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $62,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Ao utilizar GP como substrato foi observado decréscimo da conversão de glicerol de 96,3% para 56,0% ao aumentar a TCO de  $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $75,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . O %H<sub>2</sub>, PVH e HY máximos de 37,1%, 9,0 mmol H<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 0,41 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, respectivamente, foram observados para TCO igual a  $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Similarmente ao ocorrido na fermentação de GP, os %H<sub>2</sub> de 24,2%, PVH de 6,2 mmol H<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e HY de 0,32 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, máximos para fermentação do GR, foram observados para TCO de  $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Na TCO ótima de  $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  também foram observadas elevadas concentrações de EtOH (35,9% da DQO<sub>aplicada</sub>) e 1,3-PDO (26,8% da DQO<sub>aplicada</sub>), indicando que os microrganismos utilizaram o glicerol pelas rotas oxidativa e redutiva simultaneamente.

Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2014) utilizaram reator UASB mesofílico (40 °C) para produção de hidrogênio a partir de GR por *Klebsiella* sp. sob condições não estéreis. Inicialmente foi aplicado GR em concentração fixa de  $10 \text{ g L}^{-1}$ . O TDH foi decrescido de 12 h para 10 h, 8 h, 6 h, 4 h e 2 h. No TDH ótimo de 4 h foi observado HY e PVH iguais a 44,27 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> glicerol e  $165,2 \text{ mmol H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ , respectivamente. Com TDH fixo em 4 h, a concentração de GR foi acrescida de  $10 \text{ g L}^{-1}$  para  $20 \text{ g L}^{-1}$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$ , resultando em aumento da PVH de 165,5 para  $242,2 \text{ mmol H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Contudo, ao aumentar a concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$  para  $30 \text{ g L}^{-1}$  foi observado decréscimo na conversão de glicerol de 46,9% para 32,1%. O metabólito predominante na fase líquida foi o 1,3-PDO. A concentração máxima de 1,3-PDO de  $9 \text{ g L}^{-1}$  foi observada ao aplicar GR em concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Os autores inferiram que o excesso de glicerol leva ao desequilíbrio entre NAD<sup>+</sup> e NADH, e, portanto, mais NADH é utilizado na formação de 1,3-PDO pela rota redutiva. De fato, a detecção de 1,3-PDO no estudo Reungsang, Sittijunda e O-Thong (2013) também foi observada a partir do aumento da carga orgânica.

Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015) avaliaram o efeito do TDH (36 h, 48 h e 24 h), da concentração de GR ( $10 - 25 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) e do pH (6,0; 6,5 e 7,0) na produção de hidrogênio em reator em coluna com fluxo ascendente (*upflow column bioreactor*, UCB). Para o pH 6,0 e TDH fixo de 36 h não foi observado aumento significativo da PVH ( $350 - 840 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) ao aumentar a concentração de  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  para  $20 \text{ g DQO L}^{-1}$ . Ao aumentar o TDH para 48 h em concentração fixa de  $20 \text{ g DQO L}^{-1}$  também não foi observado acréscimo na PVH do reator que permaneceu em  $530 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Ao decrescer o TDH para 24 h em pH 6,0 e concentração igual a  $20 \text{ g DQO L}^{-1}$  foi observado aumento da PVH para  $1.370 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Aumento significativo da PVH de  $1.370 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  para  $2.100 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $2.860 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  foi observado ao aumentar o pH de 6,0 para 6,5 e 7,0, respectivamente,

mantendo a concentração em 20 g DQO L<sup>-1</sup> e o TDH em 24 h. Em pH 7,0 e TDH de 24 h foi observado PVH e HY máximos de 4.230 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 0,55 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol ao aumentar a concentração para 25 g DQO L<sup>-1</sup>.

Faber e Ferreira-Leitão (2016) avaliaram o efeito do pH (4,8 a 8,2), da concentração de glicerina (0,5 g L<sup>-1</sup> a 1,5 g L<sup>-1</sup>) e da concentração de sólidos suspensos voláteis (3,3 g L<sup>-1</sup> a 11,7 g L<sup>-1</sup>) na produção de hidrogênio a partir de GP em ensaios batelada sob condições mesofílicas (35 °C). Por meio de ferramenta de planejamento de experimentos os autores observaram que a concentração de sólidos suspensos voláteis não teve relevância na produção de hidrogênio a partir de GP. O HY máximo de 2,45 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol foi observado ao aplicar pH 5,5.

Rodrigues et al. (2016) utilizaram dois inóculos mistos diferentes, lodo termofílico proveniente de reator UASB utilizado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar (lodo 1) e lodo mesofílico oriundo do tratamento de esgoto municipal (lodo 2), para produção de hidrogênio a partir de 10 g L<sup>-1</sup> de GP e 10 g L<sup>-1</sup> de GR em ensaios batelada sob condições mesofílicas (37 °C). A conversão de glicerol pelo lodo 1 e lodo 2 foram iguais a 26,9% e 31,7%, respectivamente. O HY observado no ensaio em que foi aplicado o lodo 1 (2,2 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) foi superior ao HY observado no ensaio em que foi aplicado o lodo 2 (1,1 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol). Apesar do pH inicial ter sido fixado em 5,5 foi observado aumento do pH para 5,68 e 5,70 para o lodo 1 e o lodo 2, respectivamente, ao final dos ensaios experimentais. Uma hipótese para o maior valor de HY na fermentação pelo lodo 1 é que a vinhaça de cana-de-açúcar contém glicerol em sua composição (GODOI et al., 2019). Portanto, o lodo 1 estaria teoricamente mais adaptado ao substrato.

Sarma, Dubey e Moholkar (2016) realizaram otimização estatística da produção de hidrogênio a partir de glicerol. Os parâmetros avaliados foram: pH (5,0 a 8,0), temperatura (30 °C a 42 °C) e concentração de glicerol (0 a 20 g L<sup>-1</sup>). Os autores observaram %H<sub>2</sub> de 14,3% em pH 5,0 e 31,65% em pH 7,0. Ao avaliarem o efeito da concentração de glicerol em pH 7,0 e 37 °C os autores observaram que os melhores resultados em concentração igual a 6 g L<sup>-1</sup>. Nas condições otimizadas, ou seja, pH 6,7; temperatura em 36,18 °C e concentração igual a 7,4 g L<sup>-1</sup> foi observado 44% de hidrogênio no biogás e HY de 0,63 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol.

Silva-Illanes et al. (2017) avaliaram o efeito do pH (5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) e do TDH (8 a 14 h) na produção de hidrogênio pela fermentação de 10 g L<sup>-1</sup> de glicerol por cultura mista em CSTR (37 °C). Os autores observaram remoções de glicerol superiores à 92% em todos os TDH e pH aplicados. O HY máximo de 0,58 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol foi observado em pH 5,5 e TDH de 12 h. Para o TDH de 12 h foi observado HY de 0,05 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol em pH 6,5,

demonstrando que pequenas variações de pH podem ter impacto na fermentação de glicerol para produção de hidrogênio. Esta afirmação fica evidente ao observar HY de 0,26 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol em TDH de 14 h e pH 6,0, e HY de 0,02 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol em pH 5,0. As condições mais desfavoráveis para produção de hidrogênio observadas pelos autores foram a combinação de TDH de 12 h e pH 6,5, resultando em %H<sub>2</sub> de 37%, e TDH de 14 h e pH 5,0, resultando em %H<sub>2</sub> de 21%. Nos maiores TDH aplicados foi observada predominância de H<sub>2</sub>Bu na fase líquida, enquanto, em pH maiores foi observada produção de ácido succínico (HSu). A produção de 1,3-PDO não teve relação direta com a variação do TDH e do pH, visto que, este metabólito compôs entre 42,1% e 53,2% dos metabólitos líquidos produzidos em todas as condições operacionais.

Sittijunda e Reungsang (2017) avaliaram a influência da TCO na produção de hidrogênio, EtOH e 1,3-PDO a partir de GR e GP em UASB operado sob condições mesofílicas (37 °C) e pH fixo em 5,5. Inicialmente, foi aplicada GP com TCO acrescida de 25,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 62,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Foi observado aumento da conversão de glicerol de 36% para 97,5% ao aumentar a TCO de 25,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 50,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Contudo, ao aumentar a TCO para 62,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi observado decréscimo da conversão de glicerol para 64,4%. O %H<sub>2</sub>, HY e PVH máximos de 26,2%, 0,58 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol e 6,0 mmol H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, respectivamente, foram observados para TCO de 50,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Após a aplicação de 62,5 kg GP m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, os autores alteraram a alimentação do reator para GR em TCO acrescidas de 37,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 62,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Similarmente ao observado na fermentação de GP, o aumento da TCO de 37,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 50,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> acarretou aumento da conversão de GR de 58,3% para 81,5%, com decréscimo para 54,5% ao aumentar a TCO para 62,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O %H<sub>2</sub>, HY e PVH máximos para a fermentação de GR, correspondentes à 19,4%, 0,37 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol e 3,3 mmol H<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, respectivamente, também foram observados para TCO de 50,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Para a TCO de 50,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, em que ocorreu a maior produtividade de hidrogênio, o metabólito líquido predominante foi o EtOH com concentrações iguais à 7,57 g DQO L<sup>-1</sup> para a fermentação de GP e 6,8 g DQO L<sup>-1</sup> para a fermentação de GR. O aumento da TCO para 62,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na fermentação dos dois substratos acarretou aumento da produção de 1,3-PDO, que correspondeu à 36,9% e 37,8% (base em DQO) dos metabólitos líquidos produzidos na fermentação de GP e GR, respectivamente.

Vasconcelos et al. (2019) também avaliaram o efeito do aumento da TCO de 14,4 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 54,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na produção simultânea de hidrogênio e metano a partir de glicerol em reator UASB. Mesmo com pH entre 5,2 e 5,7 foi observado favorecimento das arqueias metanogênicas. O %CH<sub>4</sub> no biogás aumentou de 12,5% para 29,7% ao aumentar a TCO de

14,4 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 39,2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> enquanto o %H<sub>2</sub> se manteve estável entre 17,6% e 20,1% nessas TCO. Não foi detectado metano no biogás ao aumentar a TCO para 54,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Na TCO de 54,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi observado %H<sub>2</sub> e HY máximos de 85,17% e 0,08 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, respectivamente. Os autores observaram que mesmo não detectando metano no biogás, o aumento da TCO não foi suficiente para inibir as arqueias metanogênicas pelo acúmulo de AGVs.

Viana et al. (2019) avaliaram a inibição da metanogênese e desempenho da produção de hidrogênio a partir de GR (16 g DQO L<sup>-1</sup>) pelos inóculos mistos compostos de lodo floculento oriundo do tratamento de esgoto municipal (EM), lodo granular de reator utilizado para tratar resíduos de cervejaria (RC) e líquido ruminal (LR), nos quais foram aplicados os pré-tratamentos por clorofórmio, choque ácido e choque térmico. Os ensaios em batelada foram executados em 37 °C e pH 8,12. O HY máximos de 0,19 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, 0,12 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol e 0,21 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol para os ensaios contendo EM, RC e LR, respectivamente, foram observados ao aplicar o clorofórmio como método de pré-tratamento. Para os ensaios contendo RC e LR os HY mínimos de 0,04 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol e 0,098 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol foram observados ao utilizar o tratamento térmico como método de pré-tratamento.

García e Cammarota (2019) avaliaram os pré-tratamentos térmico, térmico + resfriamento, ácido e alcalino como métodos de inibição da metanogênese com pH 5,5 e relação DQO:N:P de 350:5:1 na produção de hidrogênio a partir de água residuária da produção de biodiesel em ensaios batelada sob condição mesofílica (30 °C). Os valores máximos de PVH iguais a 96,5 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 95,6 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> foram observadas nos ensaios em que foram aplicados os pré-tratamentos alcalino e térmico + resfriamento, respectivamente. Devido à aplicação de produto químico, a utilização de pré-tratamento térmico + resfriamento é mais vantajosa. A diferença entre a eficiência de aplicação do tratamento térmico + resfriamento e o tratamento térmico aplicado no presente estudo e no estudo de Viana et al. (2019) pode ser atribuído à etapa de resfriamento. Segundo García e Cammarota (2019), o resfriamento até a temperatura ambiente pode ter aumentado a reativação dos esporos, reduzido a fase lag e conseqüentemente aumentado a taxa de produção das bactérias produtoras de hidrogênio. Em uma segunda etapa os autores avaliaram o efeito do pH (4,0 a 5,5), da adição de NaCl (0,5 a 12 g L<sup>-1</sup>), do conteúdo de glicerol (25% a 75%) e da relação DQO:N:P na produção de hidrogênio por cultura mista pré-tratada por tratamento térmico + resfriamento. Dentre as variáveis avaliadas, o pH apresentou maior influência no HY. O HY máximo de 24,5 mL H<sub>2</sub> g

<sup>1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> e a conversão de glicerol de 81,3% foram observados em ensaio com pH 5,5, DQO total de 50 g L<sup>-1</sup> e sem adição de fontes de nitrogênio e fósforo.

Rodrigues et al. (2019) compararam a utilização de cultura pura (*Enterobacter aerogenes*) e cultura mista (lodo metanogênico termofílico oriundo de reator UASB aplicado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar) na produção de hidrogênio a partir de glicerol (20 g DQO L<sup>-1</sup>). O lodo metanogênico foi termicamente pré-tratado visando a inibição das arqueias metanogênicas. Os ensaios foram executados com pH 5,5 e temperatura em 37 °C. O tratamento térmico do lodo termofílico utilizado em ensaios mesofílicos causou seleção de microrganismos (predominância de *Clostridium* sp.). O HY observado na utilização de cultura mista foi de 0,80 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, enquanto, na utilização de cultura pura o HY foi de 0,13 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol. Na fermentação de glicerol por cultura pura foi observada produção de 1,3-PDO (1,46 g L<sup>-1</sup>). Apesar do pH inicial ter sido ajustado em 5,5, foi observado aumento do pH ao final dos experimentos para 5,61 e 5,70 nos ensaios contendo culturas mista e pura, respectivamente.

Enquanto *Enterobacter aerogenes* são microrganismos anaeróbios facultativos, bactérias do gênero *Clostridium* são estritamente anaeróbias (PAILLET et al., 2019). Elevados valores de HY são observados a partir do favorecimento de *Clostridium* (RODRIGUES et al., 2019). Porém, *Enterobacter* desempenham papel fundamental na fermentação, isto porque *Enterobacter* utilizam o oxigênio em meio micro oxidativo e colaboram para manutenção de condições anaeróbias indispensáveis para *Clostridium* (PAILLET et al., 2019). Paillet et al. (2019) avaliaram o efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (0,2 – 0,6%) na fermentação de glicerol (15 g L<sup>-1</sup>) em CSTR mesofílico (37 °C) e TDH fixo de 12 h e observaram predominância de *Clostridium* sp. apesar do ambiente micro oxidativo. Os maiores valores de HY (0,40 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) ainda foram observados ao aplicar maior concentração de peróxido de hidrogênio (0,6%). Tal ocorrência foi possibilitada pela presença de bactérias facultativas consumidoras de oxigênio. Segundo os autores, o ambiente micro oxidativo pode selecionar consórcio microbiano de tal maneira a reduzir competição pelo glicerol e maximizar a produção de hidrogênio (PAILLET et al., 2019).

A predominância de bactérias pertencentes à família *Clostridiaceae* também foi atribuída por Toledo-Alarcón et al. (2020) a maior produção de hidrogênio a partir de glicerol em CSTR. Assim como Paillet et al. (2019), Toledo-Alarcón et al. (2020) utilizaram CSTR mesofílico (37 °C) com TDH fixo em 12 h na fermentação de glicerol (7,5 g L<sup>-1</sup>). Contudo, Toledo-Alarcón et al. (2020) avaliaram o efeito do tipo de inóculo (inóculos oriundos de lodos aeróbios e anaeróbios) e pré-tratamento (térmico e por aeração) na produção de hidrogênio. A

realização de pré-tratamento ocasionou em aumento do HY em 45% com relação ao controle, o que prova a ocorrência de enriquecimento do lodo. A realização de tratamento térmico foi previamente avaliada por Viana et al. (2019) e García e Cammarota (2019), e no estudo de Toledo-Alarcón et al. (2020) resultou em predominância de microrganismos de bactérias pertencentes as famílias *Clostridiaceae* e *Enterobacteriaceae*.

A relação entre *Clostridiaceae* e *Enterobacteriaceae* na fermentação descontínua de 10 g L<sup>-1</sup> e 50 g L<sup>-1</sup> de glicerol em CSTR mesofílico (35 °C) no estudo de Silva et al. (2020) resultou em discussões divergentes às de Paillet et al. (2019) e Toledo-Alarcón et al. (2020). Silva et al. (2020) observaram os maiores valores de produção de hidrogênio nos primeiros dias de operação coincidentes com a maior abundância relativa de *Enterobacteriaceae* (89,07% em 10 g L<sup>-1</sup> e 92,8% em 50 g L<sup>-1</sup>). Contudo, no decorrer da operação foi observada redução da produção de hidrogênio atribuída a sobrecarga por AGV e aumento da pressão parcial de hidrogênio. De fato, o valor médio de HY observado em 10 g L<sup>-1</sup> (0,25 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) foi superior ao observado na fermentação de 50 g L<sup>-1</sup> (0,01 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol), uma vez que, em 50 g L<sup>-1</sup> foi observado maior acúmulo de AGV. A menor produtividade de hidrogênio ao final da operação foi atribuída à maior abundância de *Clostridiaceae* (62,6% em 10 g L<sup>-1</sup> e 53% em 50 g L<sup>-1</sup>). A divergência entre os valores de HY do CSTR do estudo de Silva et al. (2020) (0,25 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) com relação aos dos CSTRs de Toledo-Alarcón et al. (2020) (0,55 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) e Paillet et al. (2019) (0,40 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) podem ser atribuídos a operação em modo descontínuo por Silva et al. (2020).

Sittijunda e Reungsang (2020) utilizaram reator UASB termofílico (55 °C) para avaliação do efeito do aumento da TCO na fermentação contínua de GP (25 – 75 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e GP (50 – 75 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e observaram valores de HY iguais a 2,22 e 2,05 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol, respectivamente, em TCO de 62,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Os valores máximos de HY foram concomitantes a produção de EtOH e 1,3-PDO no estudo dos autores. A microbiota no UASB termofílico foi majoritariamente composta por *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sem cultura e *Klebsiella pneumoniae*. Os autores observaram que os mesmos microrganismos foram observados em todas as TCO na fermentação de GP, porém em diferentes abundâncias relativas. Isto coincidiu com a variação do perfil de metabólitos produzidos em cada TCO.

O UASB termofílico do estudo de Sittijunda e Reungsang (2020) apresentou melhor performance de produção de hidrogênio (2,22 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) do que o UASB mesofílico do estudo de Sittijunda e Reungsang (2017) (0,58 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol). No UASB mesofílico foram observadas bactérias produtoras de hidrogênio (*Clostridium* sp., *Enterobacter* sp). Contudo, Sittijunda e Reungsang (2020) relataram que em condição mesofílica o glicerol

foi metabolizado a EtOH e o NADH remanescente foi utilizado na rota redutiva para formação de 1,3-PDO. Os autores também relataram que em condição termofílica o glicerol foi metabolizado em 1,3-PDO e o NAD<sup>+</sup> recuperado foi utilizado para formação de hidrogênio. Portanto, a fermentação termofílica de glicerol pode favorecer tanto a produção de hidrogênio quanto a produção de 1,3-PDO a depender do controle biocinético aplicado.

O controle biocinético é fundamental para obtenção de maior abundância relativa de bactérias produtoras de hidrogênio. Toledo-Alarcón et al. (2020) concluíram que o estabelecimento de bactérias produtoras de hidrogênio é feito em pH baixo (5,0 – 6,0) e TDH inferior a 12 h. Porém, é possível observar a influência da concentração de substrato no perfil metabólico e nos HY da fermentação de glicerol (Tabela 5). Elevadas concentrações de glicerol estão associadas ao aumento da pressão parcial de hidrogênio e conseqüentemente ao beneficiamento da rota redutiva (SILVA et al., 2020b). Nos casos em que a o aumento da produção de 1,3-PDO pela rota redutiva o HY tende a ser reduzido porque as duas rotas competem (PARANHOS; SILVA, 2020). Neste sentido, Paranhos e Silva (2020) avaliaram o efeito da interação entre TDH (0,76 – 9,24 h) e concentração de glicerol (2,9 – 17,1 g L<sup>-1</sup>) na produção de hidrogênio em RALF mesofílico (30 °C) e observaram conteúdo de hidrogênio máximo em 12,6 g L<sup>-1</sup> e 4,58 h. A partir do máximo valor de HY (0,31 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) em 18 g L<sup>-1</sup> e 7,72 h os autores indicaram que a concentração de glicerol foi mais significativa para produção de hidrogênio do que o TDH ao considerar análise individual de cada variável.

Chen et al. (2021) avaliaram a performance da fermentação de diferentes concentrações de glicerol (5 e 15 g L<sup>-1</sup>) por cultura suspensa e imobilizada em ensaios batelada conduzidos em condição mesofílica (36 °C). Os autores apontaram que os microrganismos imobilizados apresentaram melhor performance de produção de hidrogênio em ambas as concentrações. O HY máximo de 0,52 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol foi observado na fermentação de 5 g glicerol L<sup>-1</sup> por cultura imobilizada, e foi 79,3% maior do que o observado na fermentação da mesma concentração por cultura suspensa. Em 15 g glicerol L<sup>-1</sup> o HY foi de 0,33 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol na fermentação por cultura imobilizada. Enquanto na fermentação por células suspensas o metabólito predominante foi o HAc, a fermentação por culturas imobilizadas seguiu as rotas de produção de H<sub>2</sub> e HAc. Os autores então atribuíram o pior resultado em culturas suspensas a inibição dos microrganismos pela toxicidade do HAc, uma vez que, a maior geração de NADH + H<sup>+</sup> na geração de HAc (Tabela 4) leva a maior acidificação no meio. Por outro lado, culturas imobilizadas são mais resistentes à componentes tóxicos.

A imobilização da biomassa em meio suporte foi apontada por Simões et al. (2021) como um dos motivos que possibilitaram a aplicação de elevadas TCOs (30 – 240 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)



devido ao decréscimo no TDH de 8 h para 1 h na fermentação de GR em RALFs mesofílico (30 °C) e termofílico (55 °C). A fermentação mesofílica de GR em RALF no estudo de Simões et al. (2021) não resultou em valores elevados de HY e PVH (51 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>). O mesmo foi previamente reportado por Nazareth et al. (2018) e Paranhos e Silva (2018, 2020), que indicaram que a fermentação de glicerol em RALF mesofílico não resultou em elevada produtividade de hidrogênio. Contudo, nos estudos de Simões et al., Nazareth et al. (2018) e Paranhos e Silva (2018, 2020) foram observadas elevadas conversões de glicerol em HPr e 1,3-PDO, apesar das elevadas TCOs aplicadas. Já a fermentação de GR em RALF termofílico no estudo de Simões et al. (2021) resultou em HY máximo de 1,20 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol em TDH de 1 h e HPR máxima de 35.040 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> em TDH de 0,5 h (em um posterior decréscimo do TDH). Os autores justificaram o elevado HY em RALF termofílico à produção de HBu.

Os maiores valores de HY da fermentação de glicerol por cultura mista foram observados em reatores termofílicos (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a). Contudo, Simões et al. (2021) reportaram que a conversão de GR foi baixa em AFBR termofílico (< 26%). Os autores atribuíram a baixa conversão a inibição dos microrganismos pelo acúmulo de AGV e substâncias inibitórias do GR. A inibição da fermentação por acúmulo de AGV foi previamente reportada e pode ser relacionada ao fato deste substrato ser rapidamente assimilado pelos microrganismos (ITO et al., 2005; MARU et al., 2012; CHEN; YIN; WANG, 2021). Neste contexto, a adição de cossustrato à fermentação de glicerol pode proporcionar diluição das substâncias inibitórias do GR e impedir decaimento de todo substrato no sistema (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017). Lopes et al. (2020) apontaram que a fermentação de cossustratos com características diferentes, ou seja, substratos rapidamente assimiláveis com outros que necessitam de etapa adicional de hidrólise, é importante para que não ocorra rápida depleção e acidificação no sistema. Adicionalmente, a adição de cossustrato rico em nitrogênio e fósforo no caso do glicerol pode contribuir para balanceamento nutricional no sistema (RODRIGUES et al., 2020). Isto porque é frequentemente reportada a necessidade de adição de meio nutricional na fermentação do glicerol (PARANHOS; SILVA, 2018).

### *3.3.3.2 Produção de H<sub>2</sub> utilizando glicerol como cossustrato*

A elevada biodegradabilidade e facilidade de armazenamento do glicerol foram justificativas utilizadas por estudos que o adicionaram como cossustrato na fermentação de águas residuais de moinho de azeite (FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009), fração orgânica de resíduos municipais (FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009), lodo de esgoto (RIVERO;

SOLERA; PEREZ, 2014; RODRIGUES et al., 2020), bolo de decantador de óleo de palma (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017), resíduo alimentar (SILVA et al., 2017), soro de queijo/lactose (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017; LOVATO et al., 2017a, 2017b, 2018; MIRZOYAN; TRCHOUNIAN; TRCHOUNIAN, 2019), esgoto doméstico (PRAKASH et al., 2018), manipueira (MEIER et al., 2020a), e melão de cana-de-açúcar (PEREYRA et al., 2020). Porém, a proporção ótima de glicerol a ser adicionada ainda é contraditória (Fountoulakis; Manios, 2009; Kanchanasuta; Sillaparassamee, 2017; Lovato et al., 2017a; Silva et al., 2017) e depende das características do cossubstrato, dos microrganismos, e de outras condições operacionais (tipo de reator, pH, temperatura, etc).

Fountoulakis e Manios (2009) indicaram que a adição de valores superiores a 1% v v<sup>-1</sup> de glicerol causa instabilidade na fermentação escura. Por outro lado, Kanchanasuta e Sillaparassamee (2017) avaliaram o efeito da proporção de glicerol (0,25 - 2% m v<sup>-1</sup>) na co-fermentação de bolo de decantador de óleo de palma (2% w v<sup>-1</sup>) em bateladas termofílicas (55 °C) e observaram maior produção de hidrogênio (562 mL) na maior proporção de glicerol aplicada. Silva et al. (2017) indicaram que a adição de 5% v v<sup>-1</sup> de glicerol na fermentação de resíduo alimentar levou ao HY máximo de 180 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> SV, enquanto o HY observado em mono-fermentação de resíduo alimentar foi 13 mL H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> SV. Além disso, enquanto o controle apresentou 8,4 h de fase lag, a adição de 1, 3 e 5% v v<sup>-1</sup> de glicerol levou a redução da fase lag para 5,0; 4,1; e 3,2 h, respectivamente. Então, na adição de baixas concentrações de glicerol (1 e 3% v v<sup>-1</sup>) os microrganismos tendem a metabolizar primeiramente o carboidrato. Porém, elevadas concentrações de glicerol podem aumentar a adaptação dos microrganismos ao glicerol, que realizarão metabolização simultânea de ambas as fontes de carbono (SILVA et al., 2017).

Meier et al. (2020a) avaliaram os efeitos da temperatura (37 – 43 °C) e da proporção de glicerol (1 – 5% v v<sup>-1</sup>) na co-fermentação de glicerol e manipueira por meio de planejamento estatístico de experimentos. Os autores indicaram que 4% v v<sup>-1</sup> de glicerol e 38,5 °C foram as condições otimizadas de produção de hidrogênio a partir da co-fermentação de glicerol e manipueira. A produção de hidrogênio predita nas condições otimizadas foi 1093,5 mL H<sub>2</sub> (854,2 mL H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> resíduo), enquanto os valores experimentais foram de 1102,6 mL H<sub>2</sub> e 861,4 mL H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> resíduo. O aumento da proporção de glicerol no estudo dos autores teve resultado positivo na produtividade de hidrogênio, assim como indicado por Silva et al. (2017) e Kanchanasuta e Sillaparassamee (2017). Contudo, o aumento da temperatura para valores superiores o ótimo (37 °C) resultaram em decréscimo da produção de hidrogênio. Os autores

atribuíram este decréscimo à redução da biomassa dentro dos reatores devido a desnaturação de enzimas.

Lovato et al. (2018) avaliaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio a partir da co-fermentação de 75% soro de queijo e 25% glicerol (base em DQO) em bateladas sequenciais e apontaram que a produtividade de hidrogênio caiu ao aumentar a temperatura de 30 °C para 35 °C. Lovato et al. (2018) atribuíram o decréscimo da produção de hidrogênio com o aumento da temperatura ao aumento da produção de biomassa em 35 °C, diferentemente do apontado por Meier et al. (2020a), que relacionaram o aumento da temperatura à redução da biomassa ativa no reator. Lovato et al. (2017a) avaliaram o efeito da proporção de cossubstratos na co-fermentação de soro de queijo e glicerol (100% soro, 75% soro:25% glicerol, 50% soro:50% glicerol, 25% soro: 75% glicerol, 100% glicerol) em bateladas sequenciais e observaram que na melhor condição (75% soro:25% glicerol) o HY (5,4 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) foi 145% e 27% superior a mono-fermentação de soro e glicerol, respectivamente.

Lovato et al. (2017a) indicaram que os valores superiores de HY na digestão de glicerol em relação a digestão de soro foram inesperados, pois inicialmente levantaram a hipótese que o soro é mais biodegradável que o glicerol. De fato, a eficiência de conversão de carboidratos no estudo dos autores permaneceu entre 96 e 98%, enquanto a eficiência de conversão de glicerol permaneceu entre 82 e 97%. Lopes, Ramos e Silva (2017) também observaram remoção de carboidratos igual a 71% e remoção de glicerol igual a 45% na co-fermentação de soro de queijo (5 g L<sup>-1</sup>) e glicerol (1 g L<sup>-1</sup>) em EGSB mesofílico (30 °C). Contudo, o aumento da proporção de soro:glicerol de 5:1 para 5:5 levou ao aumento da remoção de ambos os cossubstratos para 98% em TDH de 4 h (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017). Além disso, a co-digestão de soro e glicerol possibilitou a aplicação de TCO tão elevada quanto 1152 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> no EGSB. Por outro lado, é válido mencionar que os principais metabólitos produzidos na fermentação de soro e glicerol no EGSB foram HPr e 1,3-PDO, que levaram a baixos valores de HY (0,12 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>).

Com exceção de Lopes, Ramos e Silva (2017) e Pereyra et al. (2020), os estudos indicaram aumento da produção de hidrogênio ao utilizar o glicerol como cossubstrato. Um ponto em comum da adição de glicerol ao soro de queijo (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017) e ao melaço de cana-de-açúcar (PEREYRA et al., 2020), é que a co-fermentação foi realizada por cultura mista e em reatores de alta taxa. No caso destes estudos, os principais produtos da co-fermentação foram o HPr e 1,3-PDO. Isto ocorre porque o aumento da pressão parcial de hidrogênio devido à metabolização do carboidrato leva a conversão de glicerol pela rota redutiva quando em co-fermentação, e é sabido que a geração de 1,3-PDO é contrária a geração

de hidrogênio. Silva et al. (2017) também apontaram que o estado reduzido do carbono no glicerol em relação à formação de biomassa resulta em quantidade maior de NADH quando o glicerol é utilizado para crescimento celular. Então, o NADH é utilizado na formação de 1,3-PDO a partir do glicerol presente no meio, o que torna a rota redutiva constantemente ativa em sistemas contendo elevada concentração de glicerol (SILVA et al., 2017).

### 3.3.4 Fermentação escura para produção de 1,3-propanodiol

O 1,3-PDO é um produto químico com uma ampla gama de aplicações comerciais, incluindo aditivos alimentares e matéria-prima nos setores farmacêutico e cosmético (SUN et al., 2018). Além disso, o 1,3-PDO é utilizado na fabricação de poli tereftalato de etileno (PET), um plástico biodegradável, cuja produção apresenta perspectivas de expansão. Atualmente, o 1,3-PDO é majoritariamente produzido quimicamente (ZHU et al., 2021) por hidratação de acroleína, hidroformilação de óxido de etileno e transformação enzimática do glicerol (LEE et al., 2015). No entanto, a biossíntese do glicerol foi sugerida pela primeira vez há 140 anos como um método de produção de 1,3-PDO (FREUND, 1881). Além da fermentação ser um método de obtenção de produtos mais sustentável do que a fabricação química, no contexto atual, a produção de 1,3-PDO a partir do glicerol está associada ao aumento da valorização do biodiesel (SUN et al., 2018; ZHU et al., 2021), uma vez que, estima-se que os preços anuais do 1,3-PDO aumentem em até 14,2% ao ano até 2027 (ZHU et al., 2021).

A fermentação de glicerol para síntese de 1,3-PDO pode ser realizada em microrganismos dos gêneros *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. kainantoi*, *C. perfringens*, *C. bifementans*, *C. saccharobutylicum*, *C. diolis*), *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. planticola*), *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. panis*, *L. reuteri*), *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. amalonaticus*, *C. werkmanii*) e *Enterobacter* (*E. agglomerans*, *E. aerogenes*) (ZHU et al., 2021). Os microrganismos podem ser aplicados na digestão de glicerol para produção de 1,3-PDO em cultura pura com cepa selvagem (ZHANG et al., 2021), cultura pura com cepa geneticamente modificada (GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2011) e co-cultura (YUN et al., 2021). O objetivo destes estudos é maximizar o  $Y_{1,3-PDO}$  e produtividade de 1,3-PDO, além de reduzir custos, por meio da otimização de parâmetros operacionais e da definição da melhor cepa na fermentação de glicerol (GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2011; YUN et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

A necessidade de otimizar a produção de 1,3-PDO vem do fato de que cada cepa apresenta características singulares na degradação do glicerol (ZHANG et al., 2021). Por exemplo, a produção da enzima glicerol desidratase utilizada na conversão do glicerol em 3-hidroxi propionaldeído, intermediário da produção de 1,3-PDO, só é possível em alguns microrganismos pela adição de vitamina B<sub>12</sub> (PFLÜGL et al., 2012; AINALA et al., 2013; DE SANTANA et al., 2021). Pflugl et al. (2012) observaram que a concentração de 1,3-PDO em *Lactobacillus diolivorans* aumentou de 73,7 g L<sup>-1</sup> em ensaio sem adição para 84,5 g L<sup>-1</sup> em ensaio com adição de vitamina B<sub>12</sub>. O mesmo aumento da produção de 1,3-PDO foi observado por Ainala e colaboradores ao adicionarem vitamina B<sub>12</sub> na conversão aeróbia de glicerol por *Citrobacter amalonaticus* Y19 (AINALA et al., 2013). No sentido de reduzir os custos de produção, Yun et al. (2021) utilizaram co-cultura de cepas de *Escherichia coli* para produzir 1,3-PDO sem adição de vitamina B<sub>12</sub>. A estratégia adotada pelos autores para aumento da produção de 1,3-PDO foi a de adição de glicose (0 a 20 g L<sup>-1</sup>) como cossustrato ao glicerol (40 g L<sup>-1</sup>) (YUN et al., 2021). De fato, o Y<sub>1,3-PDO</sub> máximo observado por Yun et al. (2021) (0,67 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) esteve dentro da faixa observada por Pflügl et al. (2012) (0,50 – 0,86 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol).

Outra especificidade da produção de 1,3-PDO por cultura pura vem do fato de que apesar de grande parte das espécies metabolizarem o glicerol por dismutação (LEE et al., 2015), os microrganismos do gênero *Lactobacillus* realizam a desidratação de glicerol a 3-hidroxi propionaldeído e posteriormente o reduzem a 1,3-PDO, mas não possuem enzimas para desidrogenar o glicerol pela via oxidativa (ZHU et al., 2021). Portanto, estes microrganismos conseguem utilizar o glicerol como substrato para produção de 1,3-PDO mas não são capazes de retirar energia deste composto para crescimento celular (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016; DE SANTANA et al., 2021). Neste caso, a co-fermentação de glicose e glicerol também é utilizada para maximizar a produção de 1,3-PDO (PFLÜGL et al., 2012; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016; VIVEK et al., 2018; DE SANTANA et al., 2021).

Assim como na fermentação de glicerol por *Lactobacillus*, a fermentação de glicerol por *Citrobacter amalonaticus* Y19 apresenta peculiaridades. Enquanto bactérias do gênero *Lactobacillus* não são capazes de realizar crescimento celular a partir de glicerol (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016), as *Citrobacter amalonaticus* Y19 conseguem degradar o glicerol para crescimento celular e produção de 1,3-PDO (AINALA et al., 2013). Contudo, no caso de *Citrobacter amalonaticus* a degradação de glicerol só foi possível ao adicionar acceptor final de elétrons como o nitrato ou o fumarato (AINALA et al., 2013). Os inconvenientes da fermentação com cultura pura, como os observados para fermentação de glicerol por

*Lactobacillus* e *Citrobacter*, podem ser solucionados pela utilização de cultura mista (SELEMBO et al., 2009). O maior número e variabilidade de enzimas na fermentação do glicerol por cultura mista podem ocasionar em maior conversão de glicerol em sistema de cultura mista do que os observados por cultura pura (VERAS et al., 2019; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a; DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021). E é válido mencionar que apesar da concentração de glicerol não apresentar efeito na produção de 1,3-PDO (LIU et al., 2013), a conversão de glicerol está diretamente relacionada a elevados  $Y_{1,3-PDO}$  (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021). Além disso, enquanto a utilização de cultura pura aumenta o custo do processo devido à necessidade de esterilização, culturas mistas não requerem esterilização. Então, a utilização de cultura mista poderia reduzir custos e complexidade de operação em escala industrial (ZHU et al., 2021).

O  $Y_{1,3-PDO}$  por cultura mista depende das rotas seguidas pelos microrganismos na degradação de glicerol (DIETZ; ZENG, 2014). O  $Y_{1,3-PDO}$  máximo teórico a partir de glicerol como único substrato é  $0,875 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1}$  glicerol em condições ideais e micro aeróbias (LEE et al., 2015). Este  $Y_{1,3-PDO}$  teórico só seria possível se todo acetil-CoA fosse consumido pelo ciclo do ácido cítrico sem desvio de substrato para a rota oxidativa (SUN et al., 2018). Contudo, a fermentação pela rota oxidativa é necessária para formação de NADH e para geração de ATP utilizado no crescimento microbiano (MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012). Neste sentido, a geração de HAc como metabólito pela rota oxidativa pode ocasionar em maior  $Y_{1,3-PDO}$  ( $0,72 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1}$  glicerol), pois resulta em maior geração de NADH (PFLÜGL et al., 2012). O  $Y_{1,3-PDO}$  é reduzido pela geração de H<sub>2</sub>Bu pela rota oxidativa. Isto ocorre porque a geração de H<sub>2</sub>Bu por si é uma estratégia dos microrganismos para recuperar NAD<sup>+</sup>, função do 1,3-PDO quando a razão NADH/NAD<sup>+</sup> está em equilíbrio (SIMÕES, 2017). Similarmente, na redução de piruvato a HLa e EtOH também ocorre oxidação de NADH e pode reduzir o  $Y_{1,3-PDO}$  (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021).

Na fermentação de glicerol por cultura pura o  $Y_{1,3-PDO}$  é influenciado pelas condições operacionais (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016). Contudo, no caso de cultura mista, a maximização do  $Y_{1,3-PDO}$  e outros metabólitos de interesse são especialmente controlados pelo pH, temperatura e TDH (GALLARDO et al., 2014; PARANHOS; SILVA, 2018, 2020; SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a). O TDH elevado pode favorecer o consumo de hidrogênio por microrganismos de crescimento lento, como as arqueias. Por sua vez, o favorecimento do desenvolvimento de arqueias no reator acidogênico pode ocasionar em deslocamento do substrato para geração de AGV pela rota oxidativa e prejudicar a produção de 1,3-PDO (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021). Ao mesmo tempo, TDH demasiadamente

baixos (< 3 h para um reator EGSB) podem ocasionar em carga excessiva e aumento excessivo da pressão parcial de hidrogênio (GALLARDO et al., 2014; PARANHOS; SILVA, 2020). Apesar de elevada relação NADH/NAD<sup>+</sup> favorecer a produção de 1,3-PDO (LEE et al., 2015), o aumento excessivo de NADH pode desencadear geração de compostos mais reduzidos e redução do  $Y_{1,3-PDO}$ .

Gallardo et al. (2014) avaliaram o efeito do TDH (3 h a 24 h) na produção de 1,3-PDO em reatores EGSB com grânulos pré-tratados e sem pré-tratamento e relataram que entre 12 h e 6 h foram observados os maiores valores de  $Y_{1,3-PDO}$  (0.52 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol). Apesar de baixos valores de TDH como 3 h terem favorecido maior produtividade de 1,3-PDO (57 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), o  $Y_{1,3-PDO}$  caiu nesta condição operacional. Sittijunda e Reungsang (2020) observaram que a produção máxima de 1,3-PDO ocorreu em TCO de 50 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (96,7 mmol 1,3-PDO L<sup>-1</sup>). Contudo, com aumento da TCO para 62,5 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> foi observada redução da produção de 1,3-PDO (79,5 mmol L<sup>-1</sup>) e aumento da concentração de AGV, concomitante ao aumento da produção de hidrogênio (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a). O aumento da produção de AGV com o aumento da carga orgânica observado por Gallardo et al. (2014) e Sittijunda e Reungsang (2020) pode estar relacionado à geração de NADH.

A inibição dos microrganismos produtores de 1,3-PDO pelo aumento da carga orgânica pode estar diretamente relacionado à redução do pH devido à geração de AGVs (ZHU et al., 2021). Apesar do pH não afetar diretamente a produção de 1,3-PDO (MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016), este parâmetro interfere diretamente na estrutura da comunidade microbiana, na atividade de hidrogenase e nas funções metabólicas intracelulares (ELBESHBISHY et al., 2017). Dentre essas funções estão o favorecimento da geração de AGVs em determinadas faixas de pH. Por exemplo, a produção de H<sub>2</sub> é favorecida em pH entre 4,8 – 5,2 e 5,8 – 6,5, a produção de H<sub>2</sub>Pr é favorecida em pH 5,5 e a produção de EtOH em pH entre 4,0 e 5,0 (REN et al., 2007). Isto ocorre porque o pH tem relação direta com o comportamento fisiológico dos sítios ativos das enzimas e eficiência de ligação de cofatores. Então, como cada cepa apresenta características particulares com relação à produção de enzimas, o pH ótimo é diferente para cada microrganismo (VIVEK et al., 2018). Por sua vez, a geração de 1,3-PDO é dependente do perfil de AGV formado pela via oxidativa e, portanto, a produção de 1,3-PDO é indiretamente afetada pelo pH.

A redução do pH devido ao aumento da concentração de AGV também está diretamente ligada ao desequilíbrio do pH extra/intracelular. Neste caso os prótons são forçados a sair da célula por meio de um ATP e resulta em redução da energia disponível para crescimento celular (BUNDHOO; MOHEE, 2016). Para tentar frear a redução de ATP a célula pode alterar o

metabolismo para geração de álcoois (REN et al., 2007), que resultam em ATP e não ocasionam em maiores reduções de pH. Contudo, como foi previamente mencionado, a produção de EtOH leva à oxidação de NADH e por conseguinte à redução da produção de 1,3-PDO (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021). Uma das estratégias operacionais para reduzir a inibição da produção de 1,3-PDO pelo acúmulo de ácidos é adoção de temperatura na faixa termofílica. Vivek et al. (2018) apontaram que a produção de 1,3-PDO é favorecida em condição mesofílica. Porém, na fermentação de glicerol por cultura mista em reator UASB foi observado maior  $Y_{1,3-PDO}$  em condição termofílica (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a) quando comparado a condição mesofílica (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017). É válido mencionar que a operação em condição mesofílica levou à maior produção de EtOH (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2017). Isto pode ter ocorrido porque a condição mesofílica possibilita maior diversidade de microrganismos que, por sua vez, podem realizar a conversão mais rápida de substrato levando a acidificação do reator. Neste caso, o sistema tende a produzir EtOH como forma de compensar o excesso de AGV e isto prejudica a produção de 1,3-PDO.

No caso da fermentação de glicerol como substrato único a necessidade de maior geração de ATP por meio da rota oxidativa pode configurar competição pelo substrato, ou seja, o glicerol inicialmente utilizado para geração de 1,3-PDO é redirecionado para geração de AGV, ATP e NADH (XIU et al., 2007). Tais ocorrências podem ser atenuadas pela aplicação de cossustratos em sistema contendo cultura mista. Neste último caso o cossustrato seria redirecionado para geração de ATP e NADH, enquanto o glicerol seria convertido pela rota redutora em 1,3-PDO para regeneração de  $NAD^+$ .

#### 3.3.4.1 Produção de 1,3-PDO por meio da co-fermentação

Como foi previamente mencionado, as bactérias do gênero *Lactobacillus* não são capazes de utilizar o glicerol como substrato por meio da rota oxidativa (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016), em que os  $NAD^+$  são reduzidos a NADH e onde ocorre a fosforilação das moléculas de ADP. Então, a adição de um cossustrato na fermentação do glicerol por cultura pura de *Lactobacillus* é uma estratégia de fornecimento de fonte de carbono para obtenção de ATP e NADH (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016). Na fermentação do glicerol como mono-substrato por outras culturas (incluindo cultura mista) parte do glicerol é desidrogenado e ocasiona na redução de 1,3-PDO devido a competição por substrato (ZHU et al., 2021). Além disso, a obtenção do  $Y_{1,3-PDO}$  máximo ( $0,72 \text{ mol } 1,3-PDO \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$ ) depende do redirecionamento do substrato para produção de HAc como co-metabólito (PFLÜGL et al., 2012). Isto ocorre porque a regeneração de 1 mol de NADH a  $NAD^+$  é necessária para formação



de 1,3-PDO e a conversão de glicerol a acetato tem saldo de 3 mol de NADH. Porém, a conversão de glicerol a HBU, EtOH, HLa e HPr têm saldo de 2, 1, 1, e 0 mol de NADH, respectivamente. Por outro lado, o cossustrato pode ser degradado pela via metabólica Embden-Meyerhof e fornecer NADH para metabolização do glicerol pela via redutiva (STEVENSON et al., 2011). Então, o glicerol pode ser convertido em 1,3-PDO levando a  $Y_{1,3-PDO}$  superiores ao máximo possível em mono fermentação de glicerol (Tabela 6).

Tabela 6. Cossustratos utilizados na produção de 1,3-PDO a partir do glicerol

Cossustrato	Inóculo	Processo	$Y_{1,3-PDO}$	Referência
Glicose	<i>L. diolivorans</i>	Batelada alimentada	0.57	(PFLÜGL et al., 2012)
Glicose	<i>L. reuteri</i>	Batelada alimentada	0.95	(JOLLY et al., 2014)
Glicose	<i>L. brevis</i>	Batelada	0.92	(VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016)
Arabinose	<i>K. pneumoniae</i>	Batelada	0.88	(VIVEK et al., 2018)
Licor de palha	<i>K. pneumoniae</i>	Batelada	0.84	(VIVEK et al., 2018)
Cladódio de cacto	<i>L. diolivorans</i>	Batelada	0.91	(DE SANTANA et al., 2021)
Glicose	<i>E. coli</i>	Batelada	0.67	(YUN et al., 2021)
Vinhaça	Cultura mista	RALF	0.89	(SILVA et al., 2021)

Xiu et al. (2007) realizaram análise estequiométrica da co-fermentação de glicerol e glicose por *Klebsiella pneumoniae* e apontaram que a relação molar glicose/glicerol de 0,32 é suficiente para ocorra conversão total de glicerol em 1,3-PDO. De fato, em análise experimental os autores observaram que os  $Y_{1,3-PDO}$  foram de 0,46; 0,57 e 0,62 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol em relação glicose/glicerol iguais a 0; 0,1 e 0,2, respectivamente. Contudo, o aumento da concentração molar de glicose ocasionou em redução da produtividade de 1,3-PDO de 2,05 para 1,95 g h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e aumento da necessidade de correção de pH devido ao maior acúmulo de AGV (XIU et al., 2007). Pflügl et al. (2012) avaliaram o efeito da adição de glicose na produção de 1,3-PDO por *Lactobacillus diolivorans* e observaram decréscimo do  $Y_{1,3-PDO}$  de 0,84 para 0,50 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol ao aumentar a relação glicose/glicerol de 0,1 para 0,3.

Vieira et al. (2015) realizaram testes com diferentes tipos de fermentação (batelada, batelada alimentada e contínuo) na fermentação de glicose/glicerol (0,5) por *Lactobacillus reuteri*. Os testes em batelada foram conduzidos para avaliar o efeito do pH (5,5 e 6,2) na co-fermentação de glicose e glicerol. Os autores observaram baixo efeito do pH no desempenho fermentativo com  $Y_{1,3-PDO}$  atingindo 0,80 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol em pH 5,5 devido à

facilidade das bactérias em assimilar glicose em meio ácido. Por sua vez, a co-fermentação de glicose e glicerol em ensaios contínuos resultou em  $Y_{1,3-PDO}$  igual a 0,88 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol, superior a co-fermentação em batelada. Tal ocorrência já era esperada e pode ser atribuída ao fato que em ensaios batelada ocorre maior acúmulo de ácidos, que são inibitórios para o sistema. Enquanto 15 g L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO e 12,5 g L<sup>-1</sup> de acetato não foram inibitórios em testes em batelada, apenas 4 g L<sup>-1</sup> de HLa foram inibitórios ao crescimento microbiano. Contudo, em modo contínuo foi observada a possibilidade de produção de HLa como co-metabólito com rendimentos atingindo 0,82 mol HLa mol<sup>-1</sup> glicose. Então, a co-fermentação em modo contínuo permite aplicação de relação glicose/glicerol superior (0,5) com  $Y_{1,3-PDO}$  similar aos observados na fermentação em batelada com relação glicose/glicerol iguais a 0,1 (0,84 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) (PFLÜGL et al., 2012) e 0,2 (0,62 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) (XIU et al., 2007).

A glicose se mostrou um cossustrato apropriado para maximização do  $Y_{1,3-PDO}$  a partir de glicerol (Tabela 6). Contudo, a relação custo-benefício da produção fermentativa de 1,3-PDO pode ser maximizada ao aplicar resíduos como cossustratos (VIVEK et al., 2018; DE SANTANA et al., 2021). Vivek et al. (2018) avaliaram o efeito da utilização de diferentes cossustratos na fermentação de glicerol por *Klebsiella pneumoniae*, incluindo licor de palha de arroz, arabinose, sacarose, frutose, maltose, xilose, glicose e lactose. Os autores indicaram que a dissimilação do glicerol foi de 100%, 71% e 68% ao utilizar arabinose, sacarose e frutose como fontes de carbono em relação a mono-fermentação do glicerol. Os demais cossustratos (glicose, maltose, xilose e lactose) resultaram em dissimilação do glicerol inferior a 50% em relação a mono-fermentação do glicerol. É válido mencionar que o  $Y_{1,3-PDO}$  igual a 0,88 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol ao utilizar arabinose como cossustrato foi similar ao observado na fermentação de licor de palha de arroz (0,84 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol).

de Santana et al. (2021) utilizaram resíduos agroindustriais (licor de maceração de milho e licor do hidrolisado de cladódio de cacto) na produção de 1,3-PDO por *Lactobacillus diolivorans*. Nos ensaios em que foram aplicados somente glicose (2%) e glicerol (1%) como cossustratos o  $Y_{1,3-PDO}$  foi de 0,83 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol. O acréscimo de vitamina B<sub>12</sub> a glicose (2%) e glicerol (1%) resultou em aumento de 4,2% do  $Y_{1,3-PDO}$  em relação ao ensaio em que não foi utilizada vitamina B<sub>12</sub>. Já o ensaio em que foram co-fermentados glicerol (1%), licor de maceração de milho (5%) e licor do hidrolisado de cladódio de cacto (2%), o  $Y_{1,3-PDO}$  foi de 0,91 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol. Com base nesses resultados os autores atestaram viabilidade de aplicação destes resíduos na produção de 1,3-PDO e atestaram que esta seria uma alternativa viável no conceito de biorrefinaria.

Com relação à biorrefinaria da cana-de-açúcar, Silva et al. (2021) avaliaram a adição de vinhaça como cossustrato ao glicerol (25% vinhaça: 75% glicerol; 50% vinhaça: 50% glicerol; 75% vinhaça: 25% glicerol – concentração total de cossustratos igual a 10 g DQO L<sup>-1</sup>) na produção de 1,3-PDO em RALF operado sob condições termofílica (55 °C e 60 °C) e hipertermofílica (65 °C). Os autores observaram que baixa proporção de glicerol (75% vinhaça: 25% glicerol) favoreceu a produção simultânea de 1,3-PDO (0,63 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) e hidrogênio em condições termofílicas. Contudo, os maiores valores de Y<sub>1,3-PDO</sub> neste estudo foram observados em proporções iguais de glicerol e vinhaça (base em DQO) na condição hipertermofílica (0,89 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol). Os valores observados por Silva et al. (2021) foram similares aos observados na co-fermentação de glicose e glicerol (Tabela 6). Além disso, a co-fermentação de vinhaça e glicerol por cultura mista retornou resultados equiparáveis aos observados na fermentação de glicerol, licor de maceração de milho e licor do hidrolisado de cladódio de cacto (0,91 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) (DE SANTANA et al., 2021). Então, o redirecionamento de vinhaça para produção e 1,3-PDO em co-fermentação é viável como alternativa de valorização da cadeia da cana-de-açúcar.

### 3.3.5 Digestão anaeróbia da glicerina: enfoque na produção de CH<sub>4</sub>

A interrupção do processo de digestão anaeróbia em etapa de acidogênese para recuperação de hidrogênio e outros metabólitos líquidos (Figura 6) apresenta o inconveniente de efluente com elevada concentração de matéria orgânica (SIMÕES et al., 2021). Em consequência, isto implica em necessidade de tratamento adicional ao efluente. Já a produção de metano, oriunda da completa digestão do glicerol apresenta efluente com elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica. Porém, na literatura são identificados poucos estudos de produção de metano a partir de glicerol (Tabela 7) em relação a estudos de produção de hidrogênio. Ainda, há uma menor quantidade de estudos da produção sequencial de hidrogênio e metano a partir do mesmo resíduo.

Yang, Tsukahara e Sawayama (2008) avaliaram o efeito da TCO, acrescida de 0,25 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> a 0,70 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, na produção de metano a partir de água residuária contendo glicerol em APBR sob condições mesofílica (35 °C) e termofílica (55 °C). Para aumentar a capacidade tampicante do sistema foi adicionado 4 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato na alimentação dos reatores. Após este procedimento foi observada estabilidade no pH em condição termofílica (7,0 – 7,5) e instabilidade no pH em condição mesofílica, uma vez que, o pH permaneceu abaixo de 7,0 após aumentar a TCO para 0,50 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Os autores observaram maiores valores de

eficiência de remoção de matéria orgânica no reator termofílico (80,6 – 90,0%) quando comparado ao reator mesofílico (73,8 – 50,5%). O desempenho quanto à produção de metano também foi superior no reator operado à 55 °C. O MY máximo de 450 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO aplicada foi observado em TCO de 0,70 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Selma et al. (2010) utilizaram ASBR mesofílico (35 °C) para produção de metano a partir de glicerol contendo impurezas não convertidas no processo de transesterificação do biodiesel em concentrações de glicerol iguais à 0,5, 1, 2 e 3 g DQO L<sup>-1</sup>. Foi observado decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica de 93% para 40% com aumento da concentração de glicerol para 3 g DQO L<sup>-1</sup>. O MY máximo de 95,5 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> foi observado para a menor concentração de substrato aplicada. Na terceira etapa, em que foi aplicado 3 g DQO L<sup>-1</sup> em bateladas alimentadas com adição de 2,5 mg NaHCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> foi observada conversão de 73% de glicerol. A concentração de AGV no efluente (141 mg HAc L<sup>-1</sup>) foi superior a observada no afluente (44 mg HAc L<sup>-1</sup>), e com isso foi observado consumo de alcalinidade no reator (1.361 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>). O %CH<sub>4</sub> e o MY nesta etapa foram de 69% e 78,1 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente. A quarta etapa consistiu no aumento da concentração de NaHCO<sub>3</sub> para 4,5 g L<sup>-1</sup>, 6,0 g L<sup>-1</sup> e 8,0 g L<sup>-1</sup> para concentração de glicerol afluente de 3 g DQO L<sup>-1</sup>. Apesar do aumento da suplementação de alcalinidade não foi observado aumento da estabilidade da operação.

Tabela 7. Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Glicerol em estágio único e dois estágios

Reator	Substrato	Inóculo	Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TDH (d)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	pH	MY (mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
APBR	GR	Cultura mista	55	-	14	0,25-0,70	7,5	450 <sup>a</sup>	-	(YANG; TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2008)
ASBR	GR	Cultura mista	30	3,0	-	2,44	-	78	-	(SELMA et al., 2010)
AnSBBR	GR	Cultura mista	30	3,1	-	4,5	8,5	56	-	(BEZERRA et al., 2011)
ABR	GR	Cultura mista	27	15,1	10	0,5-3,0	7,5	380	-	(PHUKINGNGAM et al., 2011)
AnSBBR	GR	Cultura mista	30	3,0	-	4,5	8,0	5,3 <sup>b</sup>	-	(LOVATO et al., 2012)
CSTR	GR	Cultura mista	35	5,0	20	0,25	7,2	300	0,07	(VLASSIS et al., 2013)
ABR	GR	Cultura mista	35	30,0	10	3,0	7,2	330 <sup>a</sup>	0,99	

Tabela 7. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Glicerol em estágio único e dois estágios

Reator	Substrato	Inóculo	Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TDH (d)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	pH	MY (mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
CSTR	GR	Cultura mista	37	-	-	5,6	7,0	328	-	(HUTŇAN; KOLESÁROVÁ; BODÍK, 2013)
CSTR	GRA	Cultura mista	37	-	-	3,6	7,0	345	-	
Batelada	GR	Cultura mista	39	-	-	2,5	7,0	307	0,58	(DINH et al., 2014)
CSTR	GR	Cultura mista	70	13,0	5,5	2,4	7,0	1,1 <sup>c</sup>	-	(ZHANG et al., 2015)
ASBR	GP	Cultura mista	39	10,0	4	2,5	7,6	195	21 <sup>b</sup>	(VÁSQUEZ; NAKASAKI, 2016)
RALF	GP	Cultura mista	55	10,0	1,5	6,7	7,7	130 <sup>a</sup>	1,98	(COSTA, 2017)
RFA	EA	Cultura mista	30	12,0	1	6,0	7,0	170	-	(BOONSAWANG et al., 2015)

Tabela 7. (contin.) Compilação das condições operacionais ótimas na literatura para produção de metano a partir de Glicerol em estágio único e dois estágios

Reator	Substrato	Inóculo	Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TDH (d)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	pH	MY (mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>removida</sub> )	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	Referência
CSTR	EA	Cultura mista	35	-	-	3,71	6,7	250	-	(DOUNAVIS; NTAIKOU; LYBERATOS, 2015)
ASBR	EA	Cultura mista	37	-	-	11,25	-	79	0,67	(TANGKATHITIPONG et al., 2017)
RALF	GP	Cultura mista	30	7,6	1	7,6		267	0,88	(T.B. COSTA et al., 2021)
RALF	GP	Cultura mista	55	3,5	1	3,5		331	2,04	

ABR: *anaerobic baffled reactor*, reator anaeróbio compartimentado; ASBR: *anaerobic sequencing batch reactor*, bateladas sequenciais; AnSBBR: *anaerobic sequencing batch biofilm reactor*, bateladas sequenciais ; AnSTBR: *anaerobic structured bed reactor*, reator anaeróbio de leito estruturado; APBR: *anaerobic packed bed reactor*, reator anaeróbio e leito empacotado; CSTR: *continuous stirred tank reactor*, reator tanque agitado contínuo; EA: alimentado com efluente de reator acidogênico; GR: glicerol residual; GP: glicerina pura; GRA: glicerol residual acidificado; FVR: reator de leito estruturado; RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado; RFA: reator de fluxo ascendente; <sup>a</sup>: mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>; <sup>b</sup>: mmol CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>; <sup>c</sup>: mol CH<sub>4</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol.

Bezerra et al. (2011) também avaliaram o efeito do aumento da TCO de 1,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 6,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na conversão de glicerol a metano em AnSBBR mesofílico (30 °C). Como agente tamponante os autores adicionaram 0,5; 0,5; 1,2 e 1,3 g NaHCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> à alimentação do reator para as concentrações de glicerol de 0,98; 2,1; 3,1 e 4,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. O suplemento de alcalinidade foi considerado suficiente, visto que, apesar do aumento da TCO não foi observado acúmulo de ácidos no reator. Contudo, o decréscimo do %CH<sub>4</sub> no biogás de 72% para 51% foi atribuído ao aumento da liberação de CO<sub>2</sub> devido ao aumento da concentração de bicarbonato de sódio adicionada. Com o aumento da TCO de 1,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 6,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi observado decréscimo da remoção de DQO de 91% para 47,2% e aumento da concentração de ácidos graxos voláteis de 42 mg HAc L<sup>-1</sup> para 729 mg HAc L<sup>-1</sup>. O MY máximo de 55,5 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> foi observado em TCO de 4,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Ao avaliar o efeito do aumento da TCO de 0,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 3,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> em reatores anaeróbios compartimentados (*anaerobic baffled reactor*, ABR) mesofílicos (27 °C) alimentados com glicerol, Phukingngam et al. (2011) observaram decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica de 99% para 80% ao aumentar a TCO de 1,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 2,1 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Ao aumentar a TCO de 0,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 2,1 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi observado aumento da concentração de ácidos graxos voláteis de 12 mg HAc L<sup>-1</sup> para 64 mg HAc L<sup>-1</sup>, com relação AI/AP constante de 0,04 e 0,10. Porém, o aumento da TCO para 3,0 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> acarretou aumento da concentração de AGVs e da relação AI/AP para 410 mg HAc L<sup>-1</sup> e 0,61, respectivamente. Os autores observaram %CH<sub>4</sub> constante entre 64% e 74% e aumento da produção de biogás de 2,1 L d<sup>-1</sup> para 12,4 L d<sup>-1</sup> com o aumento da TCO de 0,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 1,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, condição em que foi observado MY máximo de 380 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>.

Similarmente à Bezerra et al. (2011), que avaliaram o efeito do aumento da TCO de 1,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 6,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na conversão de glicerol a metano em AnSBBR mesofílico (30 °C), Lovato et al. (2012) avaliaram o efeito do aumento da TCO de 4,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na conversão de glicerol à metano em AnSBBR (30 °C) em diferentes tempos de ciclo (2 h, 4 h e 6 h). Como agente alcalinizante foi adicionado 1,3 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO à alimentação dos reatores. Para a TCO afluente de 4,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi observado %CH<sub>4</sub> constante entre 71% e 75% e eficiência de remoção de matéria orgânica constante em 83% em todos os tempos de ciclo. Ao aumentar a TCO para 6,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foram observados decréscimos das eficiências de remoção de matéria orgânica para 70% e 75% em tempos de ciclo de 2 h e 4 h, respectivamente. Mesmo com menor



eficiência de remoção de matéria orgânica em 2 h os autores apontaram que ocorreu maior conversão do substrato a metano ( $5,28 \text{ mmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ).

Vlassis et al. (2013) compararam a performance de um CSTR com a de um reator anaeróbio compartimentado, ambos sob condição mesofílica ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ), na produção de metano a partir de GR. Na operação do CSTR o TDH foi mantido em 20 dias e a concentração de glicerol foi acrescida de  $5,0 \text{ g DQO L}^{-1}$  para  $7,5 \text{ g DQO L}^{-1}$  e  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$ . Inicialmente, na TCO de  $0,25 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foram observadas eficiências de remoção de matéria orgânica superiores a 95%. Contudo, ao aumentar a TCO para  $0,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi observado acúmulo de HPr e HAc, totalizando  $3,0 \text{ g DQO L}^{-1}$ . Visando a recuperação do reator, os autores reduziram a TCO para  $0,38 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Entretanto, o acúmulo de AGVs foi persistente e ocasionou decréscimo do pH para 6,5. A redução da TCO para  $0,25 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  levou aos aumentos da eficiência de remoção de matéria orgânica para 94%, da PVM para  $0,07 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e do MY para  $300 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ . Nesta TCO a alcalinidade no efluente permaneceu estável em  $3,98 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  com pH também estável de 7,2. Na operação do reator anaeróbio compartimentado foi aplicada TCO inicial de  $1,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , resultando em PVM de  $0,32 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . Ao aumentar a TCO para  $1,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $2,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi observado aumento da PVM para  $0,64 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $0,85 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ , respectivamente. O aumento da TCO para  $3,75 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ocasionou o acúmulo de ácidos ( $15 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) no reator, majoritariamente HPr ( $5,22 \text{ g DQO L}^{-1}$ ), HAc ( $2,03 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) e HBU ( $1,62 \text{ g DQO L}^{-1}$ ). No caso do reator anaeróbio compartimentado, a recuperação foi realizada mediante operação do reator em modo batelada com adição de bicarbonato de sódio. Após observar a conversão dos ácidos acumulados em metano na operação em modo batelada, os autores voltaram a operação para modo contínuo com aplicação de TCO igual a  $3,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . A PVM, o MY e a alcalinidade observada nesta TCO foram de  $0,99 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ,  $330 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  e  $3 - 4,9 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , respectivamente. Os autores concluíram que a adaptação apropriada da biomassa e o uso de reatores de alta taxa é decisivo na conversão de glicerol à metano.

Hutňan, Kolesárová e Bodík (2013) avaliaram o GR (55% de glicerina) e o GR pré-tratado em processo de acidificação (80% de glicerina) para produção de metano sob condição mesofílica ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os ensaios em batelada apresentaram remoções de glicerol superiores a 90% para ambos os substratos, com MY de  $310 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  para o GR e  $350 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  para o GR pré-tratado. Nos ensaios em CSTR com GR, o aumento da TCO de  $1,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $5,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  acarretou aumento da performance na produção de metano com %CH<sub>4</sub> de 61%. A concentração de AGVs permaneceu inferior à

700 mg L<sup>-1</sup> e o pH permaneceu estável em 7,0. Contudo, o aumento da TCO para 8,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> ocasionou em decréscimo do pH para valores abaixo de 6,0 devido ao acúmulo de AGVs. No CSTR alimentado com GR pré-tratado foi observada melhoria da performance ao aumentar a TCO de 1,2 para 3,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, que se deteriorou com o aumento da TCO para 3,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Para recuperação da estabilidade do reator a TCO foi decrescida para 3,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> com adição de bicarbonato de sódio como agente tamponante. Após estabilidade de operação em TCO de 3,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, esta foi acrescida novamente para 3,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> resultando em %CH<sub>4</sub> de 57,4%. O MY médio observado nas condições ótimas para o GR e o GR pré-tratado foram de 328 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> e 345 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente.

Também comparando a GR (55% de glicerina) e o GR pré-tratado em processo de acidificação (80% de glicerina) para produção de metano, Hutňan et al. (2013) avaliaram o desempenho de reatores UASB com biomassa imobilizada na forma de grânulos e UASB com biomassa suspensa na fermentação destes substratos diluídos (TDH de 8 h) e não diluídos (TDH de 24 h). Os autores observaram que o uso de biomassa imobilizada é preferível em relação ao uso de reatores com biomassa suspensa devido à possibilidade de aplicação de TDHs reduzidos. O MY médio observado para as duas configurações de reatores permaneceu entre 270 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> e 310 N-mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>. A TCO ótima foi de 12 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, visto que, o aumento da TCO para 15,83 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> acarretou queda do desempenho dos reatores devido ao acúmulo de AGVs.

Como reportado por Vlassis et al. (2013), a adaptação da biomassa é essencial para conversão eficiente de glicerol a metano. Dinh et al. (2014) realizaram adaptação da biomassa com solução de glicose, acetato de sódio e HLa em bateladas descontínuas executadas sob condição mesofílica (39 °C). A estratégia de operação consistiu na manutenção da TCO em 2,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e na substituição da solução de glicose, acetato de sódio e HLa por 25% de glicerol, 50% de glicerol, 75% de glicerol até a utilização de 100% de glicerol como fonte de carbono. Ao utilizar somente glicerol como fonte de carbono os autores observaram %CH<sub>4</sub> entre 59% e 64%, com PVM média de 0,58 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. A diferença de 87,9% entre o MY teórico e o real foi atribuída à utilização do substrato na síntese celular e à conversão incompleta de glicerol à metano. Os autores também observaram alterações significativas na comunidade microbiana ao alterarem a alimentação de 100% da solução preparada para 100% de glicerol, com dominância das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas quando na utilização de somente glicerol como fonte de carbono.

Zhang et al. (2015) realizaram a adaptação de lodo metanogênico mesofílico em ensaios batelada alimentados para produção de metano a partir de GR sob condição hipertermofílica. A adaptação consistiu no aumento da temperatura de 30 °C a 70 °C em passos de 2 °C por dia com adição de 1,0 grama de glicerol a cada 2 dias. Após atingir 70 °C os autores adicionaram 5,0 gramas de glicerol a cada 3 dias por 15 dias, interrompendo a alimentação até o dia 35. No dia 36 a operação em batelada alimentada foi alterada para configuração CSTR em que foram aplicadas as concentrações de GR de 5, 9 e 13 g L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 5,5 dias. A conversão de glicerol no CSTR permaneceu estável e superior à 90% em todas as concentrações aplicadas. O MY permaneceu entre 0,96 mol CH<sub>4</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol e 1,09 mol CH<sub>4</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol sem queda de desempenho com o aumento da concentração de substrato.

Vásquez e Nakasaki (2016) compararam a adaptação lenta de ASBR por estratégia similar a reportada por Dinh et al. (2014), com a aplicação direta de alta carga de GP em outro ASBR, ambos utilizados para produção de metano sob condição mesofílica (39 °C). Ambos os reatores foram operados em TDH de 4 dias e TCO fixa de 2,5 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. No ASBR em que foi aplicada adaptação lenta, com substituição de solução de glicose, acetato de sódio e lactose por solução de glicerol em proporções acrescidas de 25% a 100%, não foi observado acúmulo de AGVs. Entretanto, no reator em que foi aplicada GP foi observado acúmulo de HPr (1,6 g L<sup>-1</sup>) nos primeiros 15 primeiros dias de operação. O acúmulo dos HPr e HBU foram indicadores de sobrecarga em sistemas de digestão anaeróbia pelo aumento das bactérias ou pela redução das arqueias. Apesar do acúmulo de ácidos nos primeiros 15 dias de operação do reator em que foi aplicada alta carga, a operação em longo período proporcionou adaptação da biomassa. Os PVM e MY observados para ambos os reatores permanecerem em 21 mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 195 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente.

Vásquez e Nakasaki (2018) compararam a performance da utilização de lodo aclimatado com lodo não-aclimatado na produção de metano a partir de GP. O lodo inicialmente não-aclimatado foi adicionado em ASBR mesofílico (39 °C) com TCO afluyente fixa de 2,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O lodo não aclimatado levou 76 dias para produção estável de metano a partir do glicerol com PVM de 3,9 mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> em 30 dias de ensaio (Ensaio A). Após 97 dias de experimento, o lodo aclimatado do Ensaio A foi retirado e adicionado em outros 4 reatores em proporção de 10% (Ensaio B), 20% (Ensaio C) e 33% (Ensaio D). O acúmulo de ácidos nos Ensaios A, B, C e D foram de 1,8 g L<sup>-1</sup>, 1,0 g L<sup>-1</sup>, 0,5 g L<sup>-1</sup> e 0,3 g L<sup>-1</sup> em 30 dias de ensaio. As PVM observadas em 30 dias de operação foram de 4,9 mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, 12,4 mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e 19,9 mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> para os Ensaios B, C e D, respectivamente. Ao final dos ensaios a PVM de 21 mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> foi esperada para todos os reatores. Então, a

maior diferença entre os ensaios consistiu na fase lag, que variou de 76 dias para o lodo não-aclimatado (Ensaio A) para 20 dias no Ensaio D, com maior proporção de lodo aclimatado.

Costa (2017) realizaram aclimatação do lodo em RALF termofílico (55 °C) pelo acréscimo escalonado da concentração de glicerol de 2 g L<sup>-1</sup> a 7,5 g L<sup>-1</sup> em modo batelada alimentada por 28 dias, mantendo o pH e a taxa de recirculação de líquido fixas. Em seguida, os autores avaliaram o efeito do decréscimo do TDH de 36 h a 6 h para a concentração fixa de glicerol de 10 g L<sup>-1</sup> (TCOs entre 7 e 40 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) na operação do RALF em modo contínuo. Os maiores rendimentos de metano em estado estacionário (293 - de 307 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) foram observadas nas menores TCOs aplicadas (7 - 8 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). O decréscimo do HRT de 30 h para 12 h ocasionou no aumento da produção de AGVs. Apesar do aumento da concentração de AGVs o reator continuou apresentando elevada eficiência de conversão de glicerol, superior à 95%. Contudo, a redução do MY para 145 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> ao reduzir o TDH para 6 h indica que o RALF foi eficientemente operado como reator acidogênico.

Ao contrário de Costa (2017), T.B. Costa et al. (2021) mantiveram os RALF termofílico (55 °C) e mesofílico (30 °C) em modo batelada por 5 dias com concentração de glicerol fixa em 2 g L<sup>-1</sup>. Após observar remoção de glicerol superior a 80%, T.B. Costa et al. (2021) passaram a operar os RALFs em modo contínuo em TDH fixo de 24 h e com concentrações de glicerol acrescidas de 1 para 7 g L<sup>-1</sup>. A performance do RALF termofílico quanto à eficiência de remoção de matéria orgânica e MY (94,2% e 330 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente) foi superior a observada no RALF mesofílico (62,7% e 267 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>, respectivamente). Além disso, ao comparar a performance dos RALFs termofílicos dos estudos de Costa (2017) e T.B. Costa et al. (2021) é possível atestar que a estratégia de aumento da TCO em TDH fixo proporciona maior produtividade de metano com maior estabilidade do reator do que a de aumento da TCO pela redução do TDH (Tabela 7).

Além da importância da aclimatação do lodo no melhor desempenho da conversão de glicerol e glicerina em metano (VLASSIS et al., 2013; DINH et al., 2014; VÁSQUEZ; NAKASAKI, 2016, 2018) é importante ressaltar a aplicação da digestão anaeróbia em dois estágios como fator de melhoria do desempenho do reator metanogênico, visto que, a digestão em dois estágios proporciona maior controle operacional do processo. Boonsawang et al. (2015) realizaram a digestão anaeróbia do glicerol em dois estágios. Na etapa acidogênica foi utilizada cultura mista termicamente pré-tratada em reator anaeróbio de fluxo ascendente para fermentação de GR sob condição mesofílica (30 °C). A concentração afluenta no reator acidogênico foi acrescida de 10 g DQO L<sup>-1</sup> para 20 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 12 h. Para

aplicação do efluente do reator acidogênico em reator metanogênico foi realizado ajuste do pH para 7,0, inicialmente em 5,5. A TCO do reator metanogênico foi fixada em  $6,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  com TDH de 1 dia. Foi observada no reator metanogênico remoção de DQO de 91,3%, %CH<sub>4</sub> de 65,7% e MY de  $170 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ . Apesar da TCO relativamente elevada, a concentração de ácidos graxos voláteis no efluente do reator metanogênico não ultrapassou  $600 \text{ mg L}^{-1}$ , demonstrando estabilidade de operação.

Dounavis et al. (2016) utilizaram UCB mesofílico (35 °C) para produção de hidrogênio a partir de duas concentrações de glicerol ( $20 \text{ g L}^{-1}$  e  $25 \text{ g L}^{-1}$ ) em TDH de 24 h. O reator acidogênico apresentou 95,6% e 83,1% de conversão de glicerol e HY de 0,41 e  $0,52 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$  glicerol para as concentrações iguais a  $20 \text{ g L}^{-1}$  e  $25 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. O metabólito predominante no efluente do reator acidogênico em ambas as concentrações aplicadas foi o 1,3-PDO ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ). Inicialmente o CSTR metanogênico mesofílico (35 °C) foi operado com glicerina como substrato. Após atingir estado estacionário a glicerina foi substituída por GR, seguido pela adição de frações GR: efluente do reator acidogênico iguais a 1:5, 1:3,3, 1:2,5 de até a adição de somente efluente do reator acidogênico como substrato para produção de metano. Foi observado aumento da produção de metano de 0,2 para  $0,9 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1}$  ao aumentar a TCO para  $3,71 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . O MY foi de  $290 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  para aplicação de glicerina ( $0,77 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ),  $310 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  para a aplicação de GR ( $0,77 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) e  $250 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  ao aplicar efluente do reator do acidogênico como substrato da produção de metano em TCO de  $3,71 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . No estudo dos autores, o menor desempenho de produção de metano no reator alimentado com efluente do reator acidogênico pode ser associado ao 1,3-propanodiol como metabólito. Lymperatou, V. Skiadas e N. Gavala (2018) reportaram que a degradação de 1,3-PDO em acetil-CoA é uma reação com baixa taxa e, portanto, é etapa limitante na metanogênese. Ainda, Silva et al. (2018) indicaram que rotas de degradação de 1,3-PDO podem levar ao acúmulo de HPr, que por sua vez, pode reduzir a produtividade de metano.

Ao contrário de Dounavis et al. (2016), que observaram queda do desempenho da digestão em dois estágios, Tangkathitipong et al. (2017) realizaram digestão anaeróbia em dois estágios de glicerol suplementado com glicerina em ASBR mesofílicos (37 °C) e observaram aumento do %CH<sub>4</sub> de 60,7% para 74,8% ao crescer a TCO de  $5,63 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $11,25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . A PVM máxima de  $0,673 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e o MY máximo de  $78,81 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  foram observados em TCO de  $11,25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Isto pode ter ocorrido devido ao fato do metabólito majoritário no efluente do ASBR ter sido HAc ( $\sim 400 \text{ mg L}^{-1}$ ), substrato direto para produção de metano, enquanto a concentração de 1,3-PDO permaneceu inferior a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

No ASBR acidogênico a TCO foi acrescida de  $33,75 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $84,38 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  com controle do pH em 5,5. Os autores observaram aumento do %H<sub>2</sub> de 23,3% para 31,7% ao aumentar a TCO de 33,75 para  $67,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . A PVH e o HY máximos de  $332,54 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $7,96 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  foram observados em TCO de  $67,5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Contudo, a performance do reator acidogênico foi reduzida ao aumentar a TCO para  $84,38 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Também no reator metanogênico foi observada queda de desempenho ao aumentar a TCO para  $14,06 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

### 3.3.6 A glicerina como cossustrato na digestão anaeróbia

É notável o aumento do interesse de aplicação da glicerina como cossustrato na digestão anaeróbia (Tabela 8). No entanto, as razões para a aplicação da glicerina como cossustrato são variadas, assim como as condições ótimas de operação. Na literatura é possível identificar trabalhos que relatam a adição de substratos à glicerina, como dejetos suíno (NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012), extrusado de morango/resíduos de peixe (SERRANO et al., 2014), soro de queijo (LOVATO et al., 2016), dejetos de suínos/resíduo de matadouro pasteurizado (RODRÍGUEZ-ABALDE; FLOTATS; FERNÁNDEZ, 2017) e lodo de esgoto (FERREIRA; VOLSCHAN; CAMMAROTA, 2018). Porém, o número de trabalhos que relatam a adição de glicerina a cossustratos é superior (Tabela 8). No primeiro caso, a adição de cossustratos a glicerina é geralmente associada a redução do seu elevado conteúdo de carbono, fornecimento de balanceamento nutricional, diluição de compostos tóxicos e potencialmente inibitórios como sulfatos, MeOH e sais e/ou tratamento de duas ou mais águas residuárias no mesmo aparato experimental.

Os estudos que relatam a adição de cossustratos à glicerina são caracterizados pela aplicação de maiores doses deste substrato, por exemplo, 80% glicerol: 20% dejetos suíno (%m m<sup>-1</sup>) (NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012), 18% glicerol: 35% dejetos de suínos: 47% resíduo de matadouro pasteurizado (%m m<sup>-1</sup>) (RODRÍGUEZ-ABALDE; FLOTATS; FERNÁNDEZ, 2017); e 20% glicerol: 80% lodo de esgoto (%v v<sup>-1</sup>). Os resultados observados por esses estudos são divergentes, i.e., Nuchdang e Phalakornkule (2012) apontaram aumento da degradação de matéria orgânica pela adição de dejetos suíno à digestão de glicerina em UASB. Serrano et al. (2014) indicaram 16% de aumento da produtividade de metano ao co-digerir extrusado de morango, resíduos de peixe e glicerina. Porém, Lovato et al. (2016) não apontaram aumento significativo da produtividade de metano em co-digestão de soro de queijo e glicerol em relação a mono-digestão destes substratos em ASBR mesofílicos. Ferreira,

Volschan e Cammarota (2018) apontaram ausência de metano em ensaios mesofílicos de co-digestão de 20% glicerol: 80% lodo de esgoto (%v v<sup>-1</sup>).

Nuchdang e Phalakornkule (2012) associaram a maior biodegradabilidade da mistura glicerol e dejetos suíno à constante inoculação de microrganismos ao reator devido ao elevado conteúdo de SV neste substrato. A justificativa dos autores não se ajusta ao estudo de Ferreira, Volschan e Cammarota (2018) como deveria, uma vez que, não foi observada produção de metano na co-digestão com glicerol, apesar do lodo de esgoto também conter elevada concentração de SV. No entanto, Rodríguez-Abalde, Flotats e Fernández (2017) apontaram que o incremento de 2,9 vezes na produtividade de metano da mistura em relação a dejetos suínos pode estar relacionado ao ajuste da relação carbono/nitrogênio (C/N) e não ao efeito sinérgico na co-digestão. Portanto, a maior biodegradabilidade também determinada por Nuchdang e Phalakornkule (2012) pode estar associada ao balanceamento nutricional. Isto explica o porquê de Lovato et al. (2016) não identificarem melhorias significativas na produtividade de metano da co-digestão de soro de queijo e glicerol, visto que, ambos os substratos apresentam carência de nitrogênio.

A partir da adição de cossustratos à glicerina é possível inferir que as características de todos os componentes da mistura afetam o processo. De fato, Astals et al. (2011) atestaram a importância de identificar as condições ótimas para a co-digestão de substratos diversos a fim de atingir máxima atividade metanogênica. Ainda, Prasertsan et al. (2021) indicaram que a alteração da atividade metanogênica devido às características do glicerol podem ser relacionadas a possibilidades de conter sais, MeOH e sulfato neste substrato e que sua composição varia de acordo com a matéria prima, detalhes do processo produtivo e da sazonalidade. Por outro lado, Schwingel et al. (2019) avaliaram o efeito do tipo de glicerina e do conteúdo de glicerol na co-digestão de estrume de galinha poedeira com glicerol variando de 1 – 4%v v<sup>-1</sup> e relataram que não foram identificadas interações entre estas variáveis no conteúdo de metano. Portanto, enquanto a composição influencia fortemente a adição de cossustratos à glicerina (PRASERTSAN et al., 2021), baixas doses de glicerina adicionada podem reduzir a interferência da toxicidade intrínseca deste substrato (SCHWINGEL et al., 2019).

Tabela 8. Adição de glicerina à substratos diversos e acréscimo em produtividade de metano da co-digestão em relação à mono-digestão

<b>Cossustrato</b>	<b>Glicerol adicionado (%v v<sup>-1</sup>)</b>	<b>Reator</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>TDH (d)</b>	<b>MY</b>	<b>Acréscimo à mono- digestão (%)</b>	<b>Referência</b>
Fração orgânica de resíduos sólidos municipais	1	CSTR	1,4 <sup>a</sup>	35	23-25	2094 <sup>b</sup>	33 <sup>c</sup>	(FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009)
Águas residuais de moinho de azeitona + matadouro de aves	1	CSTR	0,8 <sup>a</sup>	35	23-25	1210 <sup>b</sup>	60 <sup>c</sup>	
Silagem de milho + soro de queijo -	4 - 9	CSTR	3,02 <sup>a</sup>	37	25	1120 <sup>d</sup>	-28 <sup>c</sup>	(KACPRZAK; KRZYSZEK; LEDAKOWICZ, 2010)
Chorume de gado	10	CSTR	-	37	-	825 <sup>e</sup>	14	(ROBRA et al., 2010)
Dejeto bovino	4	Batelada	-	35	-	246 <sup>f</sup>	800	(CASTRILLÓN et al., 2011)
Dejeto bovino	6	IBR	6,44 <sup>g</sup>	55	20	348 <sup>f</sup>	1125 <sup>c</sup>	(CASTRILLÓN et al., 2013a)
Dejeto bovino + resíduos alimentares	3	IBR	6,91 <sup>g</sup>	55	20	640 <sup>e</sup>	48	(CASTRILLÓN et al., 2013b)



Tabela 8. (cont.) Adição de glicerina à substratos diversos e acréscimo em produtividade de metano da co-digestão em relação à mono-digestão

<b>Cossustrato</b>	<b>Glicerol adicionado (%v v<sup>-1</sup>)</b>	<b>Reator</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>TDH (d)</b>	<b>MY</b>	<b>Acréscimo à mono- digestão (%)</b>	<b>Referência</b>
Lodo de esgoto municipal	3	Digestor piloto	2,38 <sup>g</sup>	36	20	930 <sup>d</sup>	1,83	(RAZAVIARANI et al., 2013)
Lodo de esgoto	3	CSTR	1,7 <sup>g</sup>	37	12,3	1400 <sup>d</sup>	4,7	(ATHANASOULIA; MELIDIS; AIVASIDIS, 2014)
<i>Sargassum sp.</i>	3	Batelada	-	37	-	283 <sup>f</sup>	56	(OLIVEIRA; ALVES; COSTA, 2015)
Lodo de esgoto municipal	1,35	CSTR	3,02 <sup>g</sup>	35	20	700 <sup>e</sup>	51 <sup>c</sup>	(RAZAVIARANI; BUCHANAN, 2015)
Lodo de esgoto	2,7	CSTR	3,0 <sup>g</sup>	35	20	325 <sup>e</sup>	23 <sup>c</sup>	(SILVESTRE; FERNÁNDEZ; BONMATÍ, 2015)
Esterco lácteo, farinha de carne e osso	0,3	CSTR	2,86 <sup>a</sup>	38	30	590 <sup>e</sup>	27	(ANDRIAMANOHIARISOAMAN ANA et al., 2018)
Lodo de esgoto	0,5	Batelada	-	30	-	413 <sup>e</sup>	66	(FERREIRA; VOLSCHAN; CAMMAROTA, 2018)
Extrato de óleo de microalga + cama de frango	3	CSTR	0,72 <sup>a</sup>	37	30	270 <sup>e</sup>	39	(MENESES-REYES et al., 2018)

Tabela 8. (cont.) Adição de glicerina à substratos diversos e acréscimo em produtividade de metano da co-digestão em relação à mono-digestão

Cossustrato	Glicerol adicionado (%v v <sup>-1</sup> )	Reator	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	TDH (d)	MY	Acréscimo à mono- digestão (%)	Referência
Dejeto de suínos	3	CSTR	1,91 <sup>a</sup>	37	17	1480 <sup>d</sup>	72 <sup>c</sup>	(LYMPERATOU; V. SKIADAS; N. GAVALA, 2018)
Lodo de esgoto	1	CSTR	2,03 <sup>g</sup>	35	9	330 <sup>f</sup>	25 <sup>h</sup>	(ZAHEDI et al., 2018)
Águas residuárias de laticínios	4	Batelada	-	35	-	1310 <sup>e</sup>	226	(CHOU; SU, 2019)
Resíduos de caixa de gordura	1	CSTR	2,2 <sup>g</sup>	-	8	376 <sup>d</sup>	24	(RASIT et al., 2019)
Dejeto de suíno e subproduto animal pasteurizado	1	CSTR	2,5	36	33	380 <sup>e</sup>	-13	(RODRÍGUEZ-ABALDE et al., 2019)
Estrume de galinha poedeira	2,5	Batelada	-	Ambiente	-	1654 <sup>e</sup>	36	(SCHWINGEL et al., 2019)
Jatropha pensada	2	Batelada	-	37	-	325 <sup>e</sup>	26	(EWUNIE; YIGEZU; MORKEN, 2020)
<i>Chlorella vulgaris</i> + descarte de batata	1	CSTR	1,20	37	20	730 <sup>f</sup>	59	(ZHANG et al., 2020c)

Tabela 8. (cont.) Adição de glicerina à substratos diversos e acréscimo em produtividade de metano da co-digestão em relação à mono-digestão

Cossustrato	Glicerol adicionado (%v v <sup>-1</sup> )	Reator	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	TDH (d)	MY	Acréscimo à mono- digestão (%)	Referência
Lixiviado de aterro	5	Batelada	-	30	-	550 <sup>e</sup>	95 <sup>c</sup>	(DE CASTRO et al., 2021)
Lixiviado de resíduo orgânico sólido municipal	13	UASB	4	37	12,5	360 <sup>f</sup>	40 <sup>i</sup>	(BERNAT et al., 2021)
Efluente de moinho de óleo de palma	1	Batelada	-	37	-	553 <sup>e</sup>	2	(PRASERTSAN et al., 2021)
Efluente de moinho de óleo de palma	5	Batelada	-	28	-	212 <sup>f</sup>	25	(SEEKAO et al., 2021)

CSTR: reator tanque agitado contínuo; IBR: reator de leito induzido; <sup>a</sup>: kg SV m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>: mL CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>: calculado a partir dos dados originais do artigo; <sup>d</sup>: mL CH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; <sup>e</sup>: mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SV; <sup>f</sup>: mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>; <sup>g</sup>: kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>; <sup>h</sup>: (SILVESTRE; FERNÁNDEZ; BONMATÍ, 2015); <sup>i</sup>: em relação à 6% de glicerina

Ferreira, Volschan e Cammarota (2018) avaliaram a influência da concentração de glicerina ( $5 - 20\% v v^{-1}$ ) na produção de metano a partir de lodo de esgoto em ensaios batelada mesofílicos ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Como foi previamente mencionado, os autores apontaram que elevadas doses de glicerina ( $20\% v/v$ ) levaram a ausência de metano devido a desequilíbrios metabólicos. Porém, a aplicação de gliceria em doses baixas ( $0,3 - 0,7\% v v^{-1}$ ) melhoraram a produção de metano em relação a digestão de lodo de esgoto como mono-substrato. Inclusive, a adição de glicerol  $0,5\% v v^{-1}$  levou a aumento de 1,7 vezes na produção de metano sem indicativos de acúmulos de ácidos ( $AI/AP < 0,3$ ). É válido mencionar que estudos que realizaram a adição de glicerina à cossustratos reportam a adição de baixas doses de glicerina ( $<10\% v v^{-1}$ ) (Tabela 8).

As justificativas mais recorrentes para a adição de glicerina como cossustrato são: (i) balanceamento da relação C/N (SILVESTRE; FERNÁNDEZ; BONMATÍ, 2015; ZHANG et al., 2020c); (ii) aumento da biodegradabilidade no reator (CASTRILLÓN et al., 2013a; DE CASTRO et al., 2020); (iii) redução da fase lag na digestão de substratos de difícil degradação (RASIT et al., 2019); (iv) aumento do crescimento de microrganismos (EWUNIE; YIGEZU; MORKEN, 2020); (v) fornecimento de alcalinidade à digestão (PRASERTSAN et al., 2021; WANG et al., 2021); (vi) tratamento de duas ou mais águas residuárias em um mesmo aparato experimental (LOVATO et al., 2016, 2019a; BORGES et al., 2021); e (vii) complementação de carga em substratos com variação sazonal de produção (NGHIEM et al., 2014; XIE et al., 2018).

Apesar da variedade de substratos co-digeridos com glicerol é possível observar que o processo é majoritariamente desenvolvido em reatores mesofílicos, ensaios batelada e CSTRs e baixa TCO (Tabela 8). Os resultados dos estudos apresentados na Tabela 8 são expressos em termos de efeitos sinérgicos, antagônicos ou independentes da adição do glicerol. Os efeitos sinérgicos são caracterizados por melhorias da digestão anaeróbia em relação à mono-digestão dos substratos adicionados (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020b) e podem ser inferidos tanto ao observar maior produtividade de metano (CASTRILLÓN et al., 2011; ATHANASOULIA; MELIDIS; AIVASIDIS, 2014; OLIVEIRA; ALVES; COSTA, 2015; LYMPERATOU; V. SKIADAS; N. GAVALA, 2018; DE CASTRO et al., 2020; ZHANG et al., 2020c) quanto ao observar a possibilidade de aplicação de TCOs mais elevadas (ROBRA et al., 2010; NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012). Os efeitos antagônicos são caracterizados pela redução da produtividade de metano em relação à mono-digestão dos substratos (KACPRZAK; KRZYSZEK; LEDAKOWICZ, 2010; RODRÍGUEZ-ABALDE; FLOTATS; FERNÁNDEZ, 2017) e pela impossibilidade de aumentar a carga devido à acidificação (ANDRIAMANOHIARISOAMANANA et al., 2017; ZAHEDI et al., 2017, 2018).

A acidificação foi a justificativa apontada por Huber et al. (2020) para o efeito antagônico da co-digestão de glicerina e cama de frango em condições termofílicas (56 °C) ao aplicarem 3% v v<sup>-1</sup> glicerina e TDH de 15 dias. Neste caso, a elevada biodegradabilidade da glicerina associada à elevada proporção adicionada, em relação ao indicado pela literatura (1% v v<sup>-1</sup>, (FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009)), podem ter potencializado o aumento das taxas de reações. As taxas de reações são mais elevadas em condições termofílicas do que em mesofílicas (RAMOS; SILVA, 2020). A redução da biodegradabilidade fica evidente ao observar que no estudo de Silvestre, Fernández e Bonmatí (2015) a co-digestão termofílica de lodo de esgoto e glicerol falhou (60 – 70% de biodegradabilidade) em relação a co-digestão mesofílica de lodo de esgoto (100% de biodegradabilidade). Isto ocorre porque o rápido aumento da concentração de ácidos pode levar a níveis de AGV inibitórios à atividade microbiana. Por exemplo, a concentração inibitória de HPr da digestão anaeróbia é de 900 mg L<sup>-1</sup> (WANG et al., 2009) e pode ser facilmente atingida pela adição de glicerol, pois a taxa de crescimento de microrganismos consumidores de HPr é lenta (ZHANG et al., 2020c) e a adição de glicerol leva a incremento deste ácido devido as suas vias metabólicas específicas (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017).

Ao contrário de Huber et al. (2020) e Silvestre, Fernández e Bonmatí (2015) que apontaram redução da produtividade de metano e da biodegradabilidade pela co-digestão termofílica, Castrillón et al. (2011) apontaram que a performance da co-digestão termofílica de esterco de gado e glicerina foi superior em condição termofílica do que em condição mesofílica. Ainda, Castrillón et al. (2013a) aplicaram 6% v v<sup>-1</sup> de glicerina ao esterco de gado e observaram incremento da produtividade de metano em TCO de 6,44 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, ou seja, proporção de glicerina e TCO superior às aplicadas por Huber et al. (2020) e Silvestre, Fernández e Bonmatí (2015). O efeito sinérgico apontado por Castrillón et al. (2013a) em relação ao efeito antagônico observado por Huber et al. (2020) e Silvestre, Fernández e Bonmatí (2015) pode estar atrelado ao fato de que os primeiros utilizaram reator de alta taxa (reator de indução, IBR – *induced bed reactor*) na co-digestão, enquanto os últimos realizaram a co-digestão em ensaios batelada e CSTR. Lympertou, V. Skiadas e N. Gavala (2018) observaram que CSTR permitiu aplicação de 3% v v<sup>-1</sup> glicerina sem efeito deletério à produção de metano, enquanto a adição de 1% v v<sup>-1</sup> glicerina foi prejudicial à digestão de dejetos de suínos em ensaios batelada. Nesse sentido, o esperado é que a adoção de reatores de alta taxa possam apresentar ainda maior capacidade de absorção de carga orgânica sem colapsar quando comparado a reatores bateladas e reatores de baixa taxa. Porém, poucos trabalhos na literatura até o presente momento adotaram

reatores de alta taxa para co-digestão com glicerina (NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012; CASTRILLÓN et al., 2013b; BERNAT et al., 2021; DE CASTRO et al., 2021).

A estabilidade da co-digestão está associada ao consumo de AGV à medida que estes são produzidos (RODRÍGUEZ-ABALDE et al., 2019). Além da temperatura e da configuração do reator, este equilíbrio na co-digestão com glicerol depende fortemente das características do cossustrato. Ewunie, Yigezu e Morken (2020) realizaram testes de biodegradabilidade de mono e co-digestão de bolo de *Jatropha* e glicerol e indicaram que devido ao bolo de *Jatropha* ser um substrato lignocelulósico e, portanto, de difícil degradação, a co-digestão apresentou efeito sinérgico em relação a mono-digestão. Os autores ainda indicaram que nesse caso a adição de glicerol pode ser econômica e ambientalmente mais vantajosa do que o pré-tratamento da biomassa. Por outro lado, Seekao et al. (2021) não observaram melhoria da co-digestão de efluente de moinho de óleo de palma e glicerol e indicaram que esta ocorrência pode estar atrelada ao fato de este efluente ser bem balanceado em termos nutricionais, com concentração de matéria orgânica biodegradável suficiente e baixa concentração de compostos potencialmente inibitórios. Já de Castro et al. (2021) apontaram que a co-digestão de glicerol com lixiviado industrial possibilitou tanto a degradação deste substrato, não possibilitada pela mono-digestão, quanto permitiu redução da adição de tamponante. Então, a adição de glicerol em complementação à deficiência de outros substratos pode ser benéfica para o tamponamento da digestão. Esses casos foram reportados para balanceamento da relação C/N e da biodegradabilidade dos materiais (CASTRILLÓN et al., 2013a; SILVESTRE; FERNÁNDEZ; BONMATÍ, 2015; DE CASTRO et al., 2020). É válido notar que em ambos os casos há o aumento do crescimento dos microrganismos e desempenho das vias metabólicas pela adição do glicerol sem acarretar acúmulo de AGVs.

Apesar do acúmulo de AGVs ter sido reportado como desvantagem da adição de glicerol como cossustratos (RAZAVIARANI et al., 2013; RAZAVIARANI; BUCHANAN, 2015; SILVESTRE; FERNÁNDEZ; BONMATÍ, 2015; ZAHEDI et al., 2017; ANDRIAMANOHIARISOAMANANA et al., 2018; HUBER et al., 2020), Zahedi et al. (2018) e Bernat et al. (2021) afirmaram que o acúmulo de AGV pode ser corrigido por manipulações do TDH e da TCO. Zahedi et al. (2018) avaliaram o efeito do aumento da TCO de 1,03 para 4,05 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na co-digestão de lodo de esgoto e glicerina em CSTR mesofílico (1% v v<sup>-1</sup>) e observaram que a performance do reator permaneceu estável até 2,03 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. A instabilidade do reator foi observada a partir de 2,89 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, quando a relação AI/AP atingiu valores superiores a 0,4. Então, para a adição fixa de glicerol o processo foi inteiramente controlado pela manipulação da carga. Em alguns casos, a adição de glicerol em cargas que

propiciam o equilíbrio entre a geração de AGV e consumo de AGV é apontada como fator de manutenção de alcalinidade no reator (DE CASTRO et al., 2021; WANG et al., 2021). Ainda, o glicerol apesar de facilmente biodegradável pode agir como tamponante devido a alcalinizante na sua composição ( $35,5 \text{ g CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) (PRASERTSAN et al., 2021).

Outra maneira de controlar o aumento de AGVs na adição de glicerina a cossustratos que pode resultar em acréscimo da produção de metano é por meio da co-digestão em dois estágios (CHAVALPARIT et al., 2018; SILVA et al., 2018; LOVATO et al., 2020; SITTIJUNDA et al., 2021; WANG et al., 2021). No entanto, apesar de dividir a digestão em dois ou mais reatores fornecer controle operacional das características intrínsecas de cada etapa do processo, a dose de glicerol ainda se mostrou limitante (CHAVALPARIT et al., 2018; SILVA et al., 2018; ROMERO-GÜIZA et al., 2021). Chavalparit et al. (2018) realizaram co-digestão de hidrolisado de óleo alcalino de cachos de palma pré-tratados e glicerol e observaram que a adição de  $0,4\% \text{ v v}^{-1}$  glicerol na digestão em dois estágios aumentou em 2,84 vezes a produção de metano sem adição de glicerol. Porém, os autores também relataram que a adição de  $0,8\% \text{ v v}^{-1}$  levou à sobrecarga pelo acúmulo de HPr. Silva et al. (2018) também indicaram que a co-digestão mesofílica ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de resíduos alimentares, lodo e glicerol para  $3\% \text{ v v}^{-1}$  glicerol apresentou 87% maior produtividade de hidrogênio do que o controle. Por outro lado,  $3\% \text{ v v}^{-1}$  apresentou efeito deletério à produção de metano devido à acúmulo de HPr. Enquanto  $1\% \text{ v v}^{-1}$  glicerol apresentou apenas 48,2% de acréscimo na produtividade de hidrogênio em relação ao controle, mas melhoria da produtividade de metano.

A determinação das condições ótimas para a fermentação em dois estágios deve levar em consideração o balanço energético total do processo, e não melhoria exclusiva das produtividades de hidrogênio ou metano. Um exemplo disso pode ser observado no trabalho desenvolvido por Sittijunda et al. (2021), os quais realizaram a co-digestão de biomassa de alga e glicerol. Os autores observaram que em condições de concentrações de glicerol, biomassa de alga e inóculo a produtividade de hidrogênio teve efeito antagônico em relação à fermentação destes substratos. Em contrapartida, a produção de metano a partir do efluente acidogênico no ponto ótimo apresentou efeito sinérgico e a recuperação energética no sistema em dois estágios foi de  $1,27 \text{ kJ g}^{-1} \text{ SV}$  contra  $0,09 \text{ kJ g}^{-1} \text{ SV}$  na digestão em um estágio. Nesse sentido, um importante achado do estudo de Lovato et al. (2020) pode auxiliar a determinar se o rendimento energético do sistema em dois estágios supre o sistema em um estágio. Os autores apontaram que um sistema de dois estágios com performance satisfatória somente supre o sistema em um estágio de o rendimento do sistema em um estágio for inferior a  $8,8 \text{ mol CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  ( $\sim 197 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ).

### 3.4 CONSIDERAÇÕES E JUSTIFICATIVAS

Apesar de potencialmente vantajosa, a co-digestão e co-fermentação de vinhaça e glicerol não foi suficientemente explorada. Lovato et al. (2019a) avaliaram a viabilidade de adicionar glicerina à vinhaça de cana-de-açúcar por meio de testes realizados em AnSBBR em diferentes modos de alimentação (batelada e batelada alimentada), proporções de vinhaça: glicerol (67%: 33%; 50%: 50%; 33%: 67% base em DQO), da TCO (5; 7,5; 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e temperatura (30 – 35 °C). Os autores apontaram que para a carga de 5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> a produtividade de metano foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de glicerol. A partir deste resultado o mais prudente foi adotar a proporção de vinhaça: glicerol que apresentou produtividade de metano intermediária (50%: 50%) na avaliação do efeito da TCO e da temperatura na produção de metano. O MY observado para a relação 50% vinhaça: 50% glicerol em 10,1 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi 93% da produção teórica de metano (350 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>).

Meier et al. (2020b) aplicaram diferentes proporções de vinhaça e glicerina (5% e 5% v v<sup>-1</sup>, 3,33% e 3,33% v v<sup>-1</sup>) como cossustratos à água residuária de suinocultura em bateladas mesofílicas (35 °C). Os autores observaram que a adição de 3,33% v v<sup>-1</sup> vinhaça e 3,33% v v<sup>-1</sup> glicerina levou ao máximo incremento da produção de metano (47,0 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO), que foi 2,7 vezes superior a produção de metano observada em mono-digestão de água residuária de suinocultura e 1,3% e 2,1% superior às co-digestões de água residuária de suinocultura com glicerol e vinhaça, respectivamente.

Borges et al. (2021) também realizaram co-digestão de vinhaça e glicerol em ensaios batelada mesofílicos (30 °C) em diferentes proporções (70%: 30%; 50%: 50%; 30%: 70% base em DQO) e observaram, assim como Lovato et al. (2019a), que a utilização do glicerol como única fonte de carbono leva à produções de metano mais elevadas do que a mono-digestão de vinhaça. No entanto, enquanto Lovato et al. (2019a) apontaram que a produtividade de metano foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de glicerol, Borges et al. (2021) relataram que maiores valores de MY (352 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) e eficiência de remoção de DQO (97%) em 50% vinhaça: 50% glicerol. O resultado destacado por Borges et al. (2021) mostra que a decisão de Lovato et al. (2019a) em adotar 50% vinhaça: 50% glicerol em testes adicionais de efeito da TCO e temperatura foi acertada. Isto ocorre porque a elevada biodegradabilidade do glicerol em baixas concentrações pode levar à elevados rendimentos de produção de metano. Porém, ao utilizar TCO mais elevadas para co-digestão, o que é desejável



do ponto de vista econômico e operacional, a elevada biodegradabilidade do glicerol pode ocasionar acúmulo de ácidos e deterioração da produção de metano (ZAHEDI et al., 2018).

Os estudos que realizaram co-digestão de vinhaça e glicerina apresentaram resultados notáveis (LOVATO et al., 2019a; BORGES et al., 2021, 2022; TAKEDA et al., 2022) e indicam que este procedimento é viável. Porém, a melhoria dos resultados obtidos depende de avaliação de co-digestão de vinhaça e glicerol em reatores de alta taxa, de avaliação de co-fermentação destes substratos e da análise de viabilidade de implantação da digestão de vinhaça e glicerol em dois estágios.

### **3.4.1 Co-digestão de vinhaça e glicerina em RALF termofílico**

Os reatores de alta-taxa são caracterizados pelo crescimento microbiano disperso e crescimento microbiano aderido. Dentre os tipos de reatores anaeróbios de alta taxa desenvolvidos se encontram os reatores UASB e os RALF. Comparado aos demais reatores de alta taxa, o RALF apresenta como vantagem uma maior área específica de sólidos exposta ao fluido, sendo, portanto, mais favorável à transferências de massa sólido líquido e gás-líquido e com maiores velocidades de reações (RAMOS; SILVA, 2020).

Com relação à utilização do RALF para produção de metano, é possível identificar estudos na literatura que ressaltam as vantagens desse reator na digestão anaeróbia de resíduos de destilaria, como: capacidade de reter elevadas concentrações de biomassa (BALAGUER; VICENT; PARÍS, 1992); excelente mistura proporcionando elevadas transferências de massa e resultando em elevadas conversões de substratos (BALAGUER; VICENT; PARÍS, 1992); baixos requerimentos de volume (ANDALIB et al., 2012); suporte de elevadas variações de carga quando comparado aos sistemas de crescimento suspenso (ANDALIB et al., 2012; SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2013); baixa produção de lodo e consequente redução dos custos de sistemas de manejo de lodo (ANDALIB et al., 2012); a possibilidade de degradação de compostos recalcitrantes (PÉREZ; ROMERO; SALES, 1998); e eliminação de problemas como colmatagem do leito e quedas de pressão (ANDALIB et al., 2012).

Ao avaliar a extensiva revisão de mono-digestão de vinhaça (Tabela 3) nas mais variadas condições operacionais observa-se elevados valores de PVM em RALF nos estudos de Siqueira, Damiano e Silva (2013) ( $5,37 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ), Andalib et al. (2012) ( $15,8 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) e Balaguer, Vicent e París (1992) ( $9,65 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) em relação às PVM observadas em AnSBBR ( $0,84 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) (ALBANEZ et al., 2016b) e reatores UASB ( $2,11\text{-}3,32 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016). A mono-digestão de glicerina em RALF (Tabela 7)

também retornou PVM de  $2,04 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ , ou seja, 2 vezes superior a atingida em ABR (VLASSIS et al., 2013), 3 vezes superior a atingida em ASBR (TANGKATHITIPONG et al., 2017) e 29 vezes superior a atingida em CSTR (VLASSIS et al., 2013). Além disso, esses maiores valores de PVM a partir do glicerol foram observados em RALF termofílico, chegando a ser 50% superiores aos valores na digestão em RALF mesofílico (T.B. COSTA et al., 2021). A mesma tendência foi observada na digestão de vinhaça, uma vez que, a PVM em AnSBBR termofílico ( $7,89 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) foi superior a observada em AnSBBR mesofílico ( $2,40 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). Entretanto, a performance da mono-digestão de vinhaça e glicerol em reatores termofílicos é reduzida pelo aumento de carga (RAMOS; SILVA, 2020; T.B. COSTA et al., 2021), enquanto a mono-digestão mesofílica apresenta maior estabilidade em cargas mais elevadas (SIQUEIRA; DAMIANO; SILVA, 2013; RAMOS; SILVA, 2020; T.B. COSTA et al., 2021). Nesse sentido, é esperado que a co-digestão acarrete sinergismo necessário para aumento de carga em RALF termofílico sem que ocorra acidificação.

### 3.4.2 Co-digestão de vinhaça e glicerina em dois estágios

#### 3.4.2.1 Co-fermentação de vinhaça e glicerina em RALF termofílico

As maiores PVH na literatura a partir de vinhaça de cana-de-açúcar foram observadas na fermentação deste substrato em RALFs termofílicos (Tabela 2) e atribuídas às características de mistura desta configuração de reator. Similarmente, a fermentação de glicerol em RALF termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) retornou PVH de  $35 \text{ L H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ , i.e., oito vezes superior à segunda maior PVH da fermentação de glicerol em reator UCB (DOUNAVIS; NTAIKOU; LYBERATOS, 2015). Então, Silva et al. (2021) utilizaram RALF termofílico para co-fermentação de diferentes proporções de vinhaça e glicerina (75%: 25%; 50%: 50%; 25%: 75% base em DQO) para concentração total de cossustratos fixa em  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  e TDH de 4 h. Contudo, os autores observaram que a co-fermentação apresentou efeito antagônico de produção de hidrogênio em relação às mono-fermentações de glicerina e vinhaça. Os maiores valores de PVH e HY foram observados em 75% vinhaça: 25% glicerina ( $2,9 \text{ L H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $0,74 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ , respectivamente), porém, foram significativamente inferiores aos observados em mono-digestão termofílica de vinhaça ( $14,4 \text{ L H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) e de glicerol ( $35 \text{ L H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). Em contrapartida, Silva et al. (2021) elencaram 50% vinhaça: 50% glicerina como a mistura mais vantajosa para co-fermentação de vinhaça e glicerina, visto que, retornou elevado  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  ( $0,89 \text{ mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}$ ). Portanto, a proporção 50% vinhaça: 50% glicerina poderia

ser adotada em TCO mais elevadas em virtude de ser a condição apontada por Silva et al. (2021) como mais vantajosa para a fermentação de vinhaça e glicerina como cossustratos e para contribuir para os RALF metanogênicos em proporção indicada como a mais adequada para metanogênese (LOVATO et al., 2019a; BORGES et al., 2021).

#### 3.4.2.2 *RALFs metanogênicos termofílico e mesofílico de segundo estágio*

Apesar do efeito aparentemente antagônico da produção de hidrogênio a partir da co-fermentação de vinhaça e glicerol é possível ainda obter efeito sinérgico da produção de metano em segundo estágio (SITTIJUNDA et al., 2021). Isto porque a acidificação dos cossustratos e possibilidade de remoção de sulfato em um reator anteriormente aos metanogênicos pode criar condições favoráveis para maximização da produtividade de metano. Dessa maneira, é necessário avaliar a digestão em dois estágios para diferentes combinações de temperatura (*temperature-phased*) (O-THONG et al., 2016; WEIDE et al., 2020; BERNAT et al., 2021; RAMOS et al., 2021; ROMERO-GÜIZA et al., 2021).

A digestão em segundo estágio mesofílico apresenta maior estabilidade, confiabilidade e menor gasto energético do que em segundo estágio termofílico (ROMERO-GÜIZA et al., 2021; TENA; PEREZ; SOLERA, 2021a). A maior velocidade das reações em condição termofílica pode ocasionar acúmulo de AGVs no reator (KIM; AHN; SPEECE, 2002). Além disso, pode haver maior sensibilidade do consórcio microbiano termofílico a sofrer impactos de alterações bruscas de temperatura, uma vez que, consórcios termofílicos são menos diversos e resilientes do que mesofílicos. Por outro lado, espera-se que a co-digestão seja suficiente para atingir processo estável termofílico - termofílico com elevada produção de biogás (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016), eficiência de remoção de sólidos (TENA; PEREZ; SOLERA, 2021a) e maior higienização do efluente (ROMERO-GÜIZA et al., 2021) do que do que o processo termofílico - mesofílico.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentados o detalhamento dos reatores, substratos, inóculos bem como os métodos analíticos empregados no decorrer da avaliação do efeito da TCO e da temperatura de operação na produção de metano em estágio único e na produção de hidrogênio e metano em dois estágios a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerina (proporção 50%: 50% em base DQO). A Figura 7 mostra o aparato experimental utilizado no desenvolvimento dos experimentos e na Figura 8 está apresentado o fluxograma geral com as condições operacionais aplicadas aos quatro RALFs utilizados.

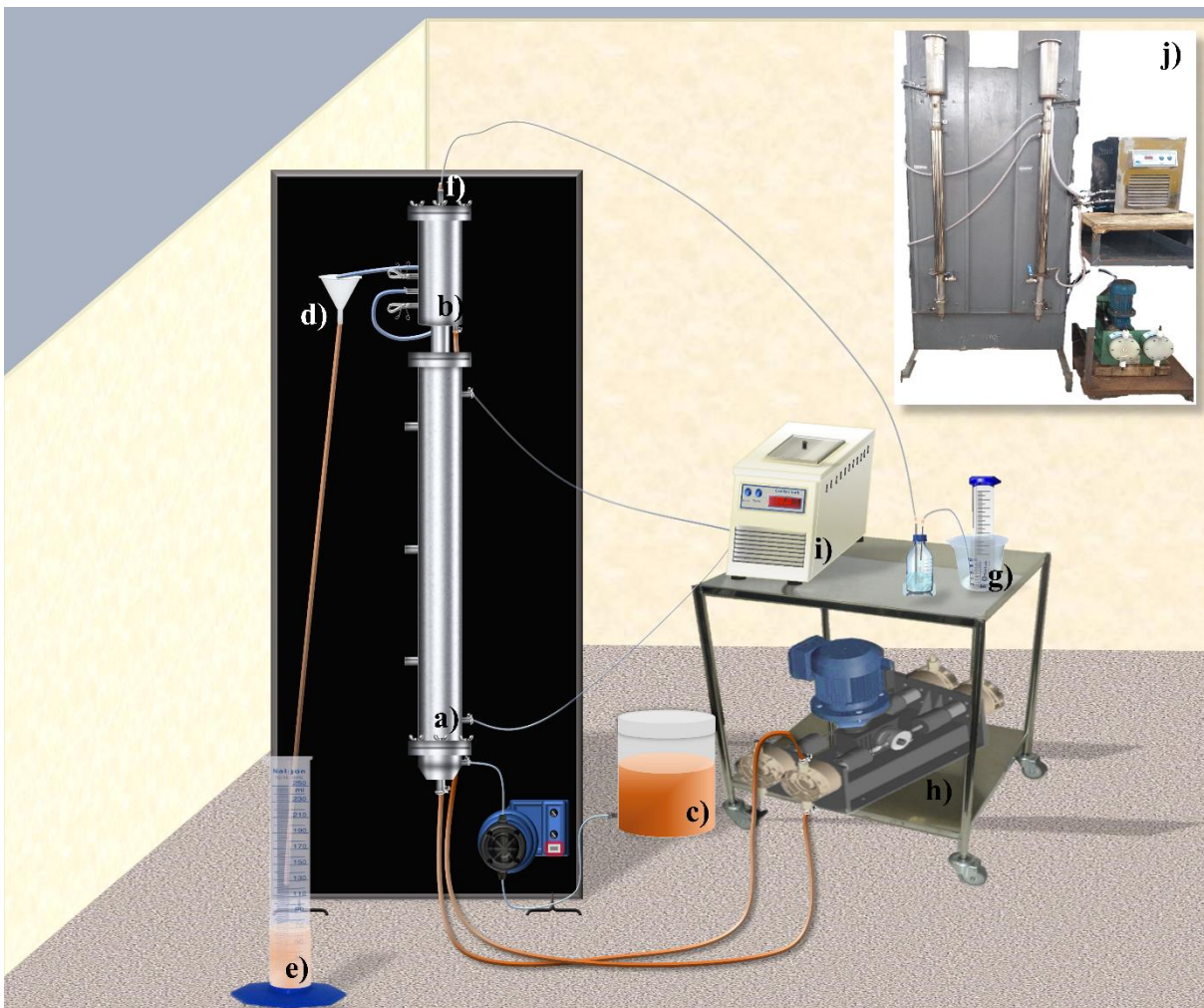


Figura 7. Aparato experimental utilizado nos experimentos, composto por: a) reator anaeróbico de leito fluidificado; b) *head-space*; c) tanque de alimentação; d) saída de efluente líquido; e) coleta e mensuração do volume de efluente; f) saída de efluente gasoso; g) medição de biogás; h) bomba de recirculação; i) banho termostatizado; j) foto do aparato experimental

- **Vinhaça + Glicerol**  
(50% + 50%)
- Meio nutricional

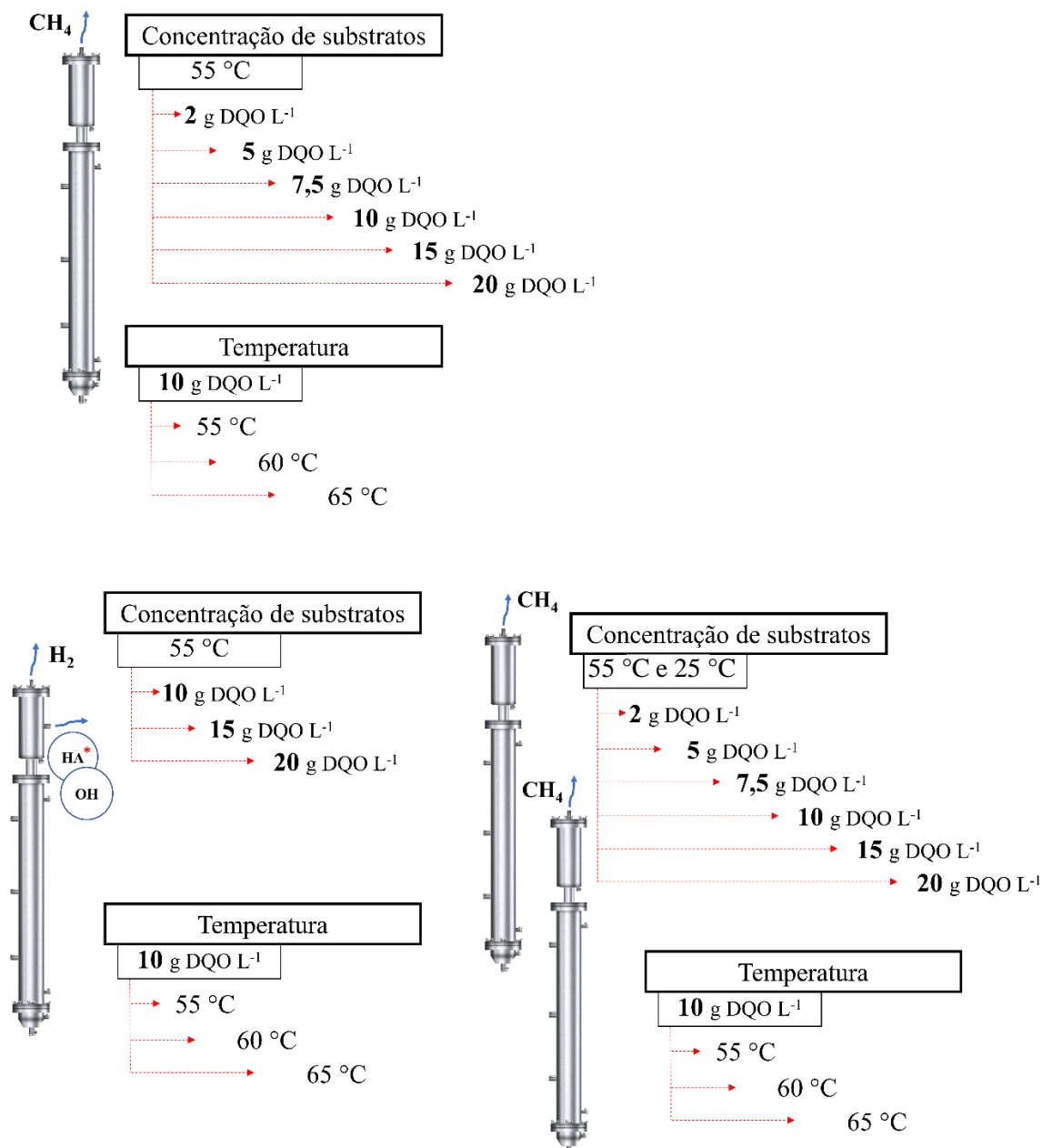


Figura 8. Fluxograma geral das condições operacionais aplicadas aos RALFs

Os RALF metanogênico termofílico de estágio único (RALF-MT), RALF acidogênico termofílico (RALF-AT), RALF metanogênico termofílico de estágio duplo (sequencial) (RALF-ST) e RALF metanogênico mesofílico de estágio duplo (RALF-SM) foram operados simultaneamente (Figura 8) em condições operacionais detalhadas no item 4.4.

#### 4.1 REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFICADO

Na Figura 9 está apresentado o RALF utilizado no desenvolvimento dos experimentos. Os RALFs com alturas e diâmetros internos de 148 cm e 3,6 cm, respectivamente, foram confeccionados em aço inox com capacidade total individual de 1,55 L (volume de trabalho). O controle de temperatura na faixa termofílica nos RALF-MT, RALF-AT e RALF-ST foi realizado por meio de banho ultratermostatizado. A troca de calor para manutenção da temperatura ocorreu pela reciclagem da água do banho em encamisamento na parte exterior e serpentina em formato de “U” no interior dos reatores.

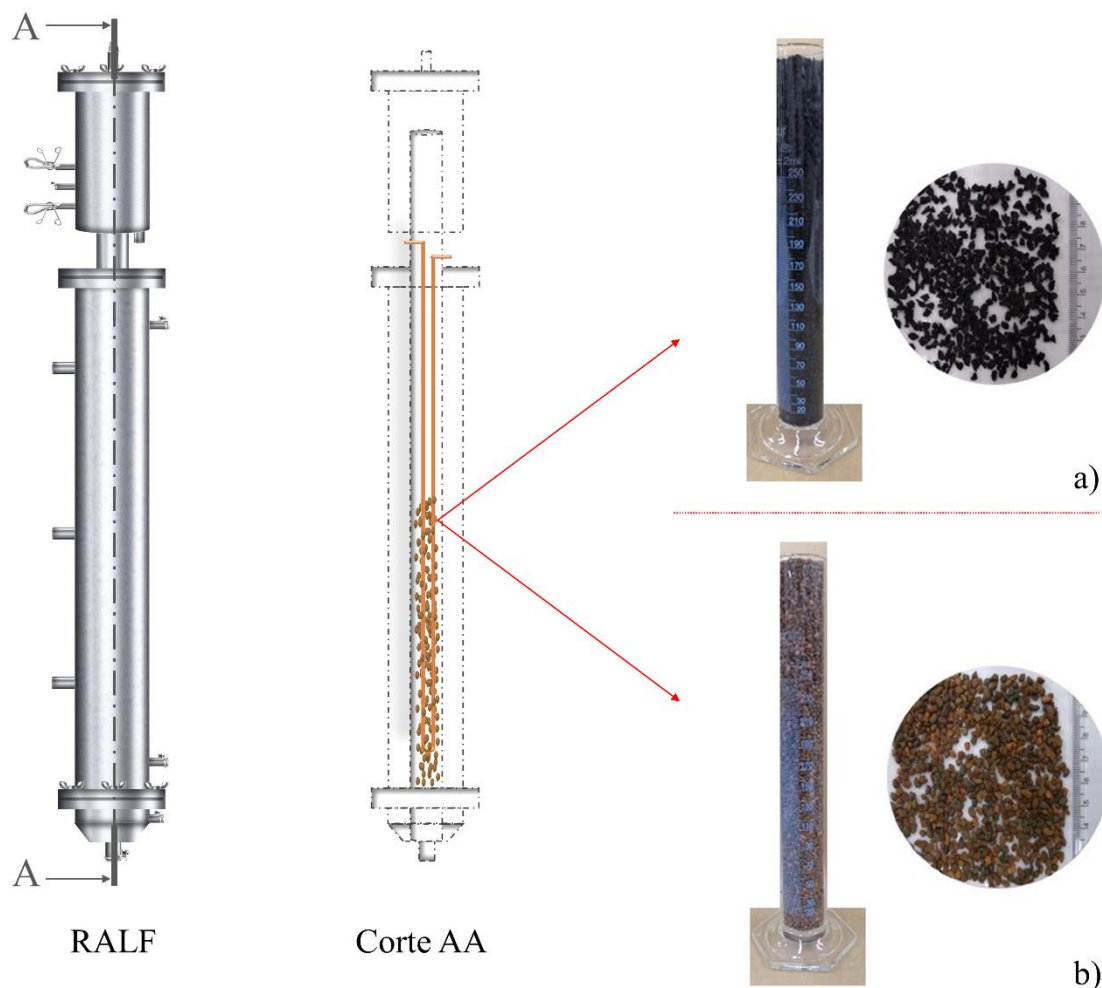


Figura 9. Representação e corte de RALF contendo material suporte: a) pneu triturado utilizado nos RALFs metanogênicos; e b) argila expandida utilizada no RALF acidogênico

O material suporte empregado na imobilização da biomassa no RALF-AT foi argila expandida (Figura 9, b) com diâmetros entre 2,8 e 3,5 mm e densidade real de  $1,06 \text{ g cm}^{-3}$ . Para

garantir velocidade superficial 30% superior à velocidade de mínima fluidização da argila expandida ( $1,24 \text{ cm s}^{-1}$ ), a vazão de recirculação do reator foi ajustada em  $58,8 \text{ L h}^{-1}$ . Já nos RALF-M, RALF-SM e RALF-ST o material suporte foi pneu triturado (Figura 9, a) com diâmetro entre 2,8 e 3,5 mm e densidade real de  $1,14 \text{ g cm}^{-3}$ . Para garantir velocidade superficial também 30% superior à velocidade de mínima fluidização do pneu triturado ( $1,18 \text{ cm s}^{-1}$ ), as vazões de recirculação dos reatores metanogênicos foram ajustadas em  $56,2 \text{ L h}^{-1}$ .

## 4.2 SUBSTRATOS

A vinhaça aplicada na produção de hidrogênio no RALF-AT e na produção de metano no RALF-MT foi coletada em oito lotes diferentes de maio de 2018 a outubro de 2020 nas Usinas São Martinho (Pradópolis, SP, Brasil), Ipiranga (Itirapina, SP, Brasil), Iracema (Iracemópolis, SP, Brasil) e da Serra (Serrana, SP, Brasil). A caracterização dos lotes de vinhaça está apresentada na Tabela 9.

A glicerina adicionada à vinhaça foi coletada na Indústria Biobrotas Oleoquímica (Brotas, SP, Brasil). Segundo especificação da Indústria Biobrotas Oleoquímica a glicerina bidestilada coletada era transparente, viscosa, solúvel em água, com densidade igual a  $1,25 \text{ g mL}^{-1}$  e teor de glicerol de 99,7%. O pH do lote de glicerina coletado permaneceu estável em 5,0 por todo o período operacional. Uma solução preparada de  $10 \text{ g glicerina L}^{-1}$  apresentou  $12,7 \text{ g DQO L}^{-1}$ , ou seja,  $1,27 \text{ g DQO g}^{-1}$  glicerina.

## 4.3 INÓCULOS

A fonte de inóculo utilizada para partida operacional do RALF-SM foi proveniente do lodo metanogênico mesofílico de UASB utilizado no tratamento de efluente do abatedouro de aves, Avícola Dacar (Tietê, SP, Brasil). O lodo metanogênico mesofílico apresentou pH 7,2, concentração de sólidos totais igual a  $46,3 \pm 2,0 \text{ g L}^{-1}$  e concentração de sólidos voláteis igual a  $36,9 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1}$ . A fonte de inóculo utilizada para partida operacional dos reatores termofílicos (RALF-MT, RALF-AT, RALF-ST) foi proveniente do lodo metanogênico termofílico de um reator UASB utilizado no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar na usina São Martinho. O lodo metanogênico termofílico apresentou pH 7,7 e concentrações de sólidos totais e voláteis iguais a  $20,8 \pm 5,5$  e  $12,3 \pm 3,3 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Tabela 9. Caracterização dos lotes de vinhaça de cana-de-açúcar

	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>	<b>Lote 4</b>	<b>Lote 5</b>	<b>Lote 6</b>	<b>Lote 7</b>	<b>Lote 8</b>
<b>Coleta</b>	mai/18	jul/18	nov/18	dez/18	jul/19	set/19	out/19	out/20
<b>Usina</b>	<b>SMTO</b>	<b>SMTO</b>	<b>IGA</b>	<b>IMA</b>	<b>SMTO</b>	<b>SMTO</b>	<b>SMTO</b>	<b>PDRA</b>
Materia orgânica (DQO) (mg L <sup>-1</sup> )	28472	33147	29594	112291	36699	41935	33988	99103
σ	3029	6281	1049	264	804	2099	736	1621
Carboidratos totais (sacarose) (mg L <sup>-1</sup> )	2607	5232	6073	9547	5850	5095	4517	21329
σ	25	339	80	380	85	105	98	415
Glicerol (mg L <sup>-1</sup> )	1406,7	1533,0	1608,9	774,4	1561,4	1583,0	1480,2	1644,2
σ	103	24	2	25	18	13	43	5
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	5412,5	2917,9	12361,1	14970,0	9431,1	6800,0	6769,2	36691,7
σ	47	42	96	3870	70	59	55	164
Sólidos suspensos voláteis (mg L <sup>-1</sup> )	4587,5	2564,1	11577,8	11670,0	8391,1	5766,7	5784,6	32741,7
σ	48	41	95	3870	70	59	54	164
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	2200	2150	1400	55000	2100	2550	2600	4500
Nitrogênio (NTK) (mg L <sup>-1</sup> )	432	367	> 1000	462	622	404	493	971
Fósforo (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) (mg L <sup>-1</sup> )	17	43	185	8	16	12	9	57
Ácido láctico (mg L <sup>-1</sup> )	762	2354	1611	5245	1463	3103	3528	2895
Ácido fórmico (mg L <sup>-1</sup> )	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4451,3	N.D.	N.D.	N.D.
Ácido acético (mg L <sup>-1</sup> )	N.D.	N.D.	4253	11683	5570	N.D.	N.D.	N.D.
Ácido isobutírico (mg L <sup>-1</sup> )	2356	586	1450	8834	N.D.	3427	1491	1063
Ácido butírico (mg L <sup>-1</sup> )	2078	275	N.D.	8638	N.D.	1198	N.D.	N.D.
Ácido valérico (mg L <sup>-1</sup> )	N.D.	N.D.	N.D.	1882	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

SMTO: Usina São Martinho (Pradópolis, SP, Brasil); IGA: Usina Ipiranga (Itirapina, SP, Brasil); IMA: Usina Iracema (Iracemópolis, SP, Brasil);

PDRA: Usina da Serra (Serrana, SP, Brasil).



Para aplicação no RALF-AT o lodo metanogênico termofílico foi termicamente pré-tratado de acordo com a metodologia proposta por Kim, Han e Shin (2006). O pré-tratamento térmico consistiu na elevação da temperatura do lodo à 90 °C por 10 minutos. Em seguida foi o lodo foi resfriado até temperatura ambiente (25 °C) (GARCÍA; CAMMAROTA, 2019).

#### 4.4 OPERAÇÃO DOS REATORES

Neste subitem serão especificadas as condições operacionais aplicadas aos RALF-MT, RALF-AT, RALF-ST e RALF-SM na avaliação do efeito da TCO e da temperatura de operação na produção de metano em estágio único e na produção de hidrogênio e metano em dois estágios a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerina (proporção 50%: 50% em base DQO).

##### 4.4.1 RALF-MT

Na Figura 10 estão ilustradas as condições operacionais aplicadas ao RALF-MT. Adicionalmente, na Tabela 10 as condições operacionais aplicadas estão detalhadas de acordo com o tempo de operação e lote de vinhaça utilizado (Tabela 9).

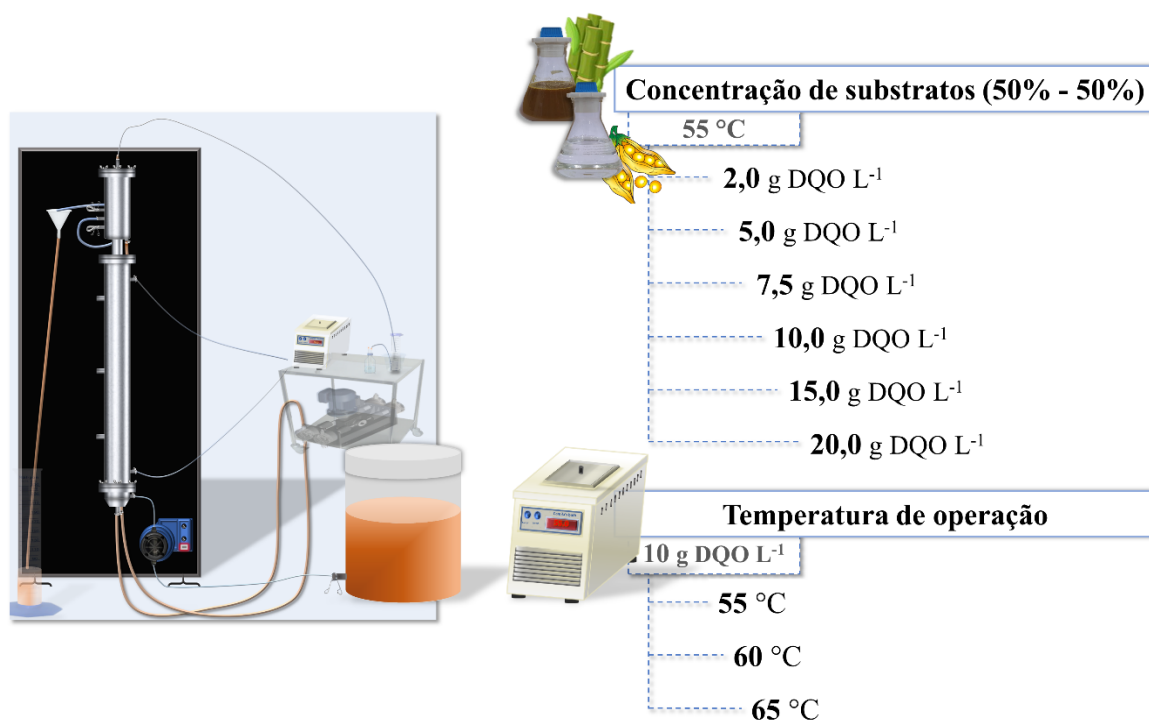


Figura 10. Condições operacionais aplicadas ao RALF-MT

Tabela 10. Condições operacionais aplicadas, tempo de operação e lote de vinhaça utilizado em cada etapa de operação da produção de metano em estágio único

<b>Etapa</b>	<b>Concentração (g DQO L<sup>-1</sup>)</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de operação (d)</b>	<b>Vinhaça utilizada</b>
Inoculação 1	-	2,0 <sup>a</sup>	55	17	Lote 1
1	2,0	2,0	55	72	Lotes 1 e 2
2	5,0	5,0	55	61	Lotes 2
3	7,5	7,5	55	107	Lote 3
4	10,0	10,0	55	98	Lotes 4 e 5
5	15,0	15,0	55	145	Lote 5
Inoculação 2	-	2,0 - 15,0 <sup>a</sup>	55	76	Lote 7
6	15,0	15,0	55	54	Lote 7
7	20,0	20,0	55	49	Lotes 7 e 8
8	10,0	10,0	60	25	Lotes 6 e 7
9	10,0	10,0	65	23	Lote 7

TDH: tempo de detenção hidráulica; TCO: taxa de carregamento orgânico; <sup>a</sup>: concentração de substratos

A avaliação do efeito do aumento da TCO na produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol (proporção 50%: 50% em base DQO) (etapas 1 a 7, Tabela 10) foi subdividida em: i) aumento lento da concentração de cossustratos em reator aberto (etapas 1 a 5, Tabela 10) e ii) aumento rápido e escalonado da concentração de cossustratos em reator fechado (Inoculação 2).

#### 4.4.1.1 Aumento lento e escalonado da concentração de cossustratos em modo contínuo

Na Inoculação 1 do RALF-MT (Figura 11) foram adicionados 272 gramas de partículas de pneu triturado no reator, correspondente à 50 cm da altura do reator (leito fixo).

Posteriormente foi preparado um tanque de alimentação com volume total de 8 litros contendo: 10% (v/v) de lodo metanogênico termofílico, meio nutricional (Tabela 11), 1 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça, 1 g DQO L<sup>-1</sup> de glicerina e 16 g NaHCO<sub>3</sub> (1 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO L<sup>-1</sup>). A solução do tanque de alimentação foi submetida à purga com N<sub>2</sub> por 10 minutos e posteriormente o tanque foi acoplado à bomba de recirculação do RALF-MT, no qual a temperatura estava ajustada em 55 °C. Após a ligação da bomba de recirculação também foi realizada purga com N<sub>2</sub> no *head-space* do reator por 5 minutos.

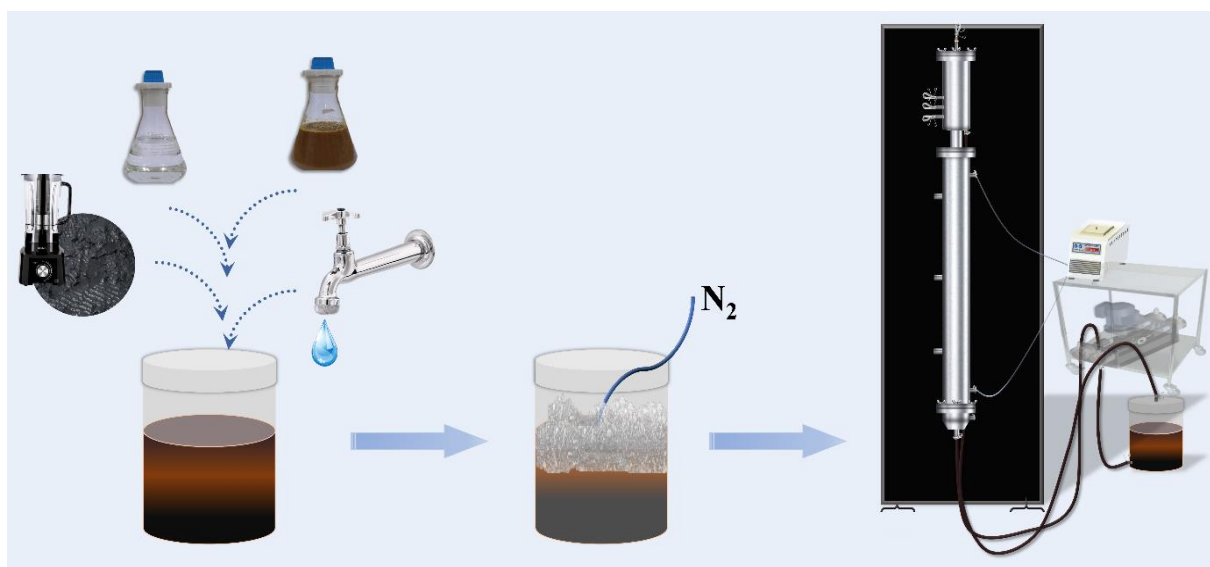


Figura 11. Sequência dos procedimentos de inoculação do RALF

Tabela 11. Meio nutricional utilizado na alimentação dos RALF-AT e RALF-MT

Composto	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21,7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	33,4
NiSO <sub>4</sub>	1,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	125,0
CaCl <sub>2</sub>	47,0
CoCl <sub>2</sub>	0,08
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5
SeO <sub>2</sub>	0,07

Fonte: Del Nery, 1983

Na Inoculação 1 a solução do tanque de alimentação foi recirculada no RALF-MT por 17 dias. Neste período foram monitoradas diariamente a concentração de carboidratos totais, a concentração de glicerol, a DQO e o pH. Após o consumo de 80% da matéria orgânica adicionada (verificada por meio da análise de DQO) o RALF-MT foi operado em modo contínuo com concentração total afluyente de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50% em base DQO) de 2,0 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH de 24 h. A partir da Inoculação 1 a avaliação do efeito da TCO na produção de metano no RALF-MT foi realizada pelo aumento escalonado e lento da concentração de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50%) de 2,0 para 15,0 g DQO L<sup>-1</sup> em reator contínuo (TDH de 24 h). A alteração da condição operacional consistiu no aumento da concentração de cossustratos (proporção 50%: 50%) ao se observar estabilização da produção de metano e da remoção de DQO por 20 dias consecutivos, ou seja, variação inferior a 10% do MY (mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>).

#### *4.4.1.2 Aumento rápido da concentração de cossustratos em modo batelada*

Os procedimentos iniciais da Inoculação 2 do RALF-MT foram similares aos procedimentos da Inoculação 1 (Figura 11): adição de pneu triturado ao RALF, preparo do tanque de alimentação contendo meio nutricional, 1 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça, 1 g DQO L<sup>-1</sup> de glicerina e 16 g NaHCO<sub>3</sub> (1 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO L<sup>-1</sup>). Contudo, na Inoculação 2 o aumento da concentração de cossustratos (proporção 50%: 50% em base DQO) de 2,0 para 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 g DQO L<sup>-1</sup> foi realizado pela adição de vinhaça, glicerol e NaHCO<sub>3</sub> (1 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO L<sup>-1</sup>) no tanque de alimentação em recirculação. Na Inoculação 2 foram realizadas análises diárias para determinar concentração de carboidratos totais, concentração de glicerina, concentração de matéria orgânica (DQO), concentração de sulfato, concentração de AGV e alcalinidade à bicarbonato. O aumento da concentração de cossustratos em modo batelada foi realizado ao observar por duas vezes consecutivas em uma determinada concentração a remoção de matéria orgânica superior a 80% e relação AI/AP inferior a 0,5.

Após o aumento da concentração de cossustratos (proporção 50%: 50% em base DQO) de 2,0 para 15,0 g DQO L<sup>-1</sup> em modo batelada, o RALF-MT foi operado em modo contínuo com concentração de cossustratos de 15,0 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH de 24 h. Uma etapa adicional de aumento da concentração de cossustratos para 20,0 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH de 24 h foi realizada após observar estabilização da produção de metano (PVM e MY) e da remoção de DQO por 20 dias consecutivos em 15,0 g DQO L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.1.3 Efeito do aumento da temperatura na produção de metano

A avaliação do efeito da temperatura (dentro da faixa termofílica) na produção de metano a partir de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50%) foi realizado para concentração de cossustratos em 10 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH de 24 horas. Após a avaliação do efeito do aumento da TCO na produção de metano no RALF-MT em 55 °C a concentração de cossustratos foi ajustada para 10 g DQO L<sup>-1</sup> até o estado estacionário aparente. Posteriormente, a temperatura foi acrescida para 60 °C e em seguida 65 °C. O aumento da temperatura foi realizado ao se observar estabilização da produção de metano e da remoção de DQO por 10 dias consecutivos.

#### 4.4.2 RALF-AT

Na inoculação do RALF-AT o tanque de alimentação foi preparado contendo 5,0 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça, 5,0g DQO L<sup>-1</sup> de glicerol, meio nutricional (Tabela 11) e lodo pré-tratado (10% v/v). Similarmente ao RALF-MT, a solução do tanque de alimentação foi purgada com N<sub>2</sub> por 10 minutos e posteriormente o tanque foi acoplado ao RALF contendo partículas de argila expandida (337 gramas ou 50 cm de altura). O conteúdo do tanque de alimentação foi recirculado no RALF-AT (modo batelada) pelo tempo necessário para redução das concentrações de glicerina e de carboidratos totais em 80%, ou seja, por 4 dias.

Nas Figura 12 e Tabela 12 estão apresentadas todas as condições aplicadas na operação do RALF-AT em modo contínuo. O RALF-AT foi inicialmente operado em modo contínuo com concentração total de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50%) afluyente igual a 10,0 g DQO L<sup>-1</sup>, TDH de 4 h e 55 °C por 266 dias. Posteriormente foi realizado aumento da concentração total de cossustratos para 15,0 g DQO L<sup>-1</sup> e 20,0 g DQO L<sup>-1</sup> com TDH e temperatura mantidos em 4 h e 55 °C, respectivamente. Após a avaliação do efeito do aumento da TCO de 60 para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi avaliado o efeito do aumento da temperatura de 55 °C para 60 °C e 65 °C na produção de hidrogênio e metabólitos líquidos no RALF-AT (10,0 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH de 4 h). É válido mencionar que o efluente do RALF-AT foi utilizado na alimentação dos RALF-ST e RALF-SM. Portanto, a alteração da condição operacional no RALF-AT foi realizada após se observar estabilidade (variação inferior a 10%) na produção de metano (PVM e MY) e na remoção de DQO em ambos os RALF-ST e RALF-SM por período superior a 20 dias consecutivos. Na operação do RALF-AT em modo contínuo foram monitorados o pH, a vazão líquida, a concentração de glicerina, a concentração de carboidratos totais, a concentração de matéria orgânica (DQO), a concentração de sulfato, a concentração de

ácidos e álcoois, a produção volumétrica de biogás e a composição de biogás. Os resultados apresentados do RALF-AT foram os compilados durante o estado estacionário dos RALF-ST e RALF-SM.

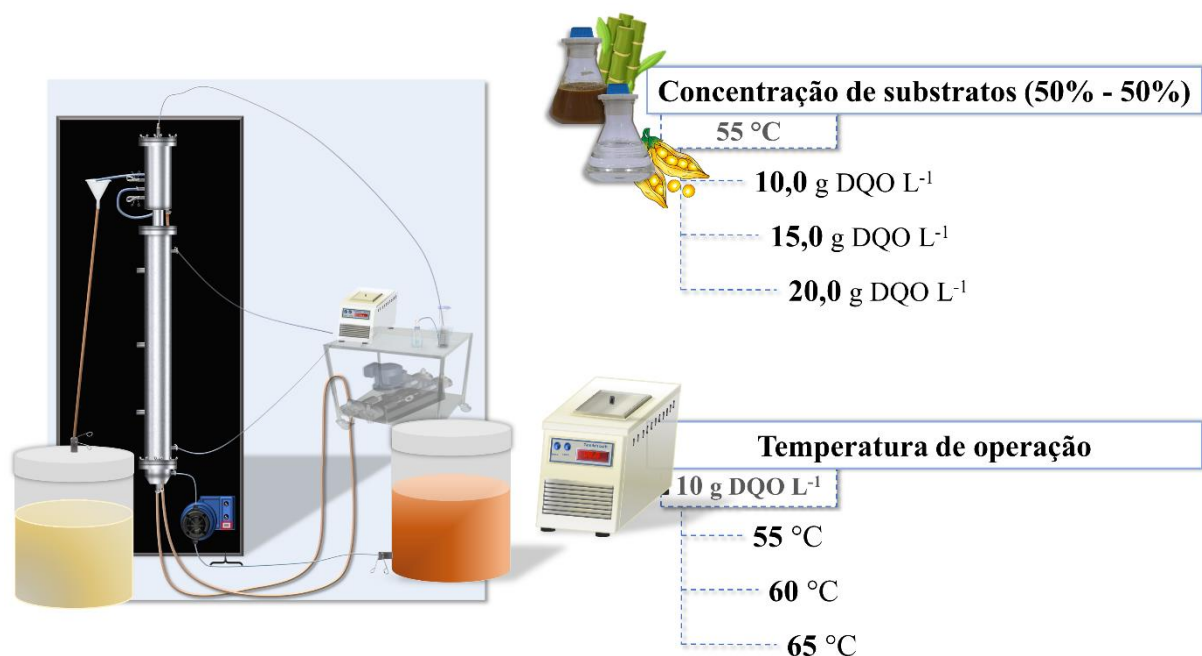


Figura 12. Condições operacionais aplicadas ao RALF-AT

Tabela 12. Condições operacionais aplicadas, tempo de operação e lote de vinhaça utilizado em cada etapa de operação da produção de hidrogênio e metabólitos solúveis

Etapa	TDH (h)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo de operação (d)	Vinhaça utilizada
1	4	60	55	266	Lotes 2, 3 e 4
2	4	90	55	145	Lotes 5 e 6
3	4	120	55	67	Lotes 7 e 8
4	4	60	60	25	Lotes 6 e 7
5	4	60	65	23	Lote 7

TDH: tempo de detenção hidráulica; TCO: taxa de carregamento orgânico.

#### 4.4.3 RALF-ST e RALF-SM

Na Figura 13 estão apresentadas as condições operacionais aplicadas ao RALF-ST. Na Tabela 13 estão detalhadas as condições operacionais aplicadas em conjunto com as etapas de operação do RALF-AT (Tabela 12) das quais o efluente foi utilizado na alimentação dos RALF-ST e RALF-SM.

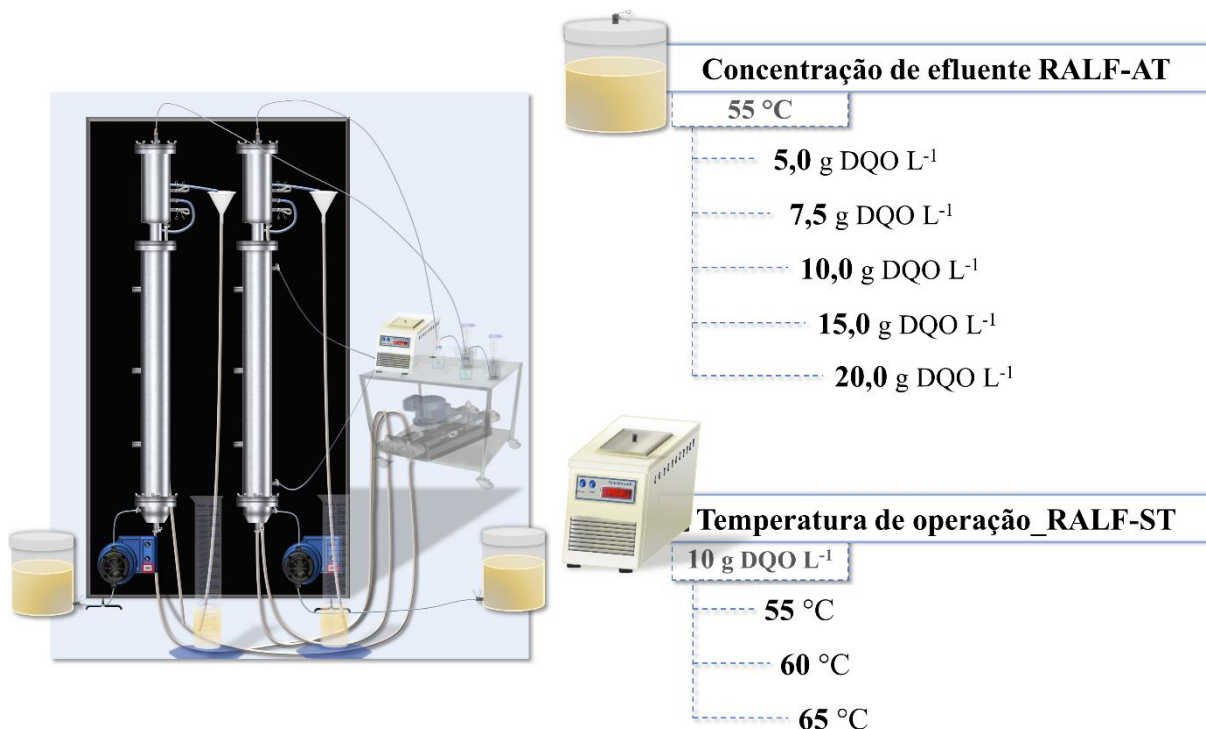


Figura 13. Condições operacionais aplicadas aos RALF-ST

A inoculação dos reatores foi realizada por meio da confecção de dois tanques de alimentação (Figura 11) contendo meio nutricional (Tabela 11), 1 g DQO L<sup>-1</sup> de vinhaça, 1 g DQO L<sup>-1</sup> de glicerina, 16 g NaHCO<sub>3</sub> (1 g NaHCO<sub>3</sub> g<sup>-1</sup> DQO L<sup>-1</sup>) e 10% (v/v) de lodo termofílico para o RALF-ST e lodo mesofílico para o RALF-SM. Assim como no RALF-MT foram adicionados 272 gramas de partículas de pneu triturado nos reatores, as soluções dos tanques de alimentação foram purgadas com N<sub>2</sub> e os tanques foram ligados as bombas de recirculação. No caso do RALF-SM a remoção de 80% da matéria orgânica adicionada (DQO) foi observada após 15 dias de operação em modo batelada. Contudo, os RALF-ST e RALF-SM foram mantidos em recirculação por 17 dias, i. e., pelo período necessário para remoção de 80% da matéria orgânica adicionada (DQO) no RALF-ST. Então, os RALF-ST (55 °C) e RALF-SM (25 °C) passaram a ser operados em modo contínuo com concentração total afluente de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50% em base DQO) de 2,0 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH de 24 h.

Os RALF-ST e RALF-SM foram alimentados com vinhaça e glicerina (2,0 g DQO L<sup>-1</sup>) até observação do estado estacionário aparente por 20 dias consecutivos. Para avaliação do

efeito do aumento da TCO na produção de hidrogênio e metano em dois estágios com reatores metanogênicos termofílico e mesofílico os reatores foram alimentados com efluente do RALF-AT (~10,0 g DQO L<sup>-1</sup>) diluído para 5,0 e 7,5 g DQO L<sup>-1</sup> nas etapas 2 e 3, respectivamente. Nas etapas 3, 4 e 5 os RALF-ST (55 °C) e RALF-SM (25 °C) foram alimentados com efluente do RALF-AT (55 °C) sem diluição com concentrações aproximadas de 10, 15 e 20 g DQO L<sup>-1</sup>, respectivamente. Novamente, o aumento da TCO foi realizado ao observar estabilização da produção de metano e da remoção de DQO por 20 dias consecutivos em ambos os RALF-ST e RALF-SM, i. e., variação inferior a 10% do MY (mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>).

Tabela 13. Condições operacionais aplicadas e tempo de operação de cada etapa da produção de metano em estágio duplo (sequencial) em RALFs termofílico e mesofílico

<b>Etapa</b>	<b>Concentração (g DQO L<sup>-1</sup>)</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C) RALF-ST/RALF- SM</b>	<b>Tempo de operação (d)</b>	<b>Vinhaça utilizada</b>
1	2,0	2,0	55/25	72	Lote 1
2	5,0	5,0	55/25	61	EA-Etapa 1
3	7,5	7,5	55/25	107	EA-Etapa 1
4	10,0	10,0	55/25	98	EA-Etapa 1
5	15,0	15,0	55/25	145	EA-Etapa 2
6	20,0	20,0	55/25	103	EA-Etapa 3
7	10,0	10,0	60/25	25	EA-Etapa 4
8	10,0	10,0	65/25	23	EA-Etapa 5

TDH: tempo de detenção hidráulica; TCO: taxa de carregamento orgânico; EA: efluente acidogênico.

Para avaliação do efeito da temperatura na produção de hidrogênio e metano em dois estágios com reatores metanogênicos termofílico e mesofílico a concentração afluente ao RALF-AT foi reduzida para 10,0 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH de 4 h. A temperatura do RALF-AT foi acrescida de 55 °C para 60 °C por 25 dias e, subsequentemente, para 65 °C por 23 dias. Durante a avaliação do efeito da temperatura na fermentação de vinhaça e glicerina no RALF-AT, os RALF-ST e RALF-SM foram alimentados com efluente não-diluído. Adicionalmente, foi



realizado, simultaneamente ao RALF-AT, o acréscimo da temperatura do RALF-ST para 60 °C e 65 °C.

#### 4.5 ANÁLISES FISÍCO-QUÍMICAS

No efluente líquido dos reatores foram realizadas análises diárias de pH e análises em frequência de três vezes por semana de DQO, sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF), sólidos suspensos voláteis (SSV), concentração de carboidratos, concentração de glicerina, e concentrações de ácidos e álcoois. No efluente líquido dos reatores metanogênicos foram realizadas análises de alcalinidade à bicarbonato e ácidos graxos voláteis, também em frequência de três vezes por semana.

As análises de pH, DQO, SST, SSF e SSV foram realizadas de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2005). A determinação da concentração de carboidratos foi realizada por método espectrofotométrico (DUBOIS et al., 1956). A determinação da concentração de glicerol foi realizada de acordo com metodologia proposta por Bondioli e Della Bella (2005). O monitoramento da concentração de HLa nos afluentes e efluentes dos reatores foi realizado por meio de análise espectrofotométrica (TAYLOR, 1996). As concentrações de ácidos orgânicos e álcoois foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de acordo com método especificado por Santos et al. (2014b). A concentração de 1,3-PDO foi determinada de acordo com método proposto por Paranhos e Silva (2018). A determinação da alcalinidade à bicarbonato e de ácidos graxos voláteis foi realizada de acordo com Ripley, Boyle e Converse (1986) e DiLallo e Albertson (1961), respectivamente.

As análises do efluente gasoso dos reatores foram realizadas em frequência de três vezes por semana e consistiram em avaliação da produção volumétrica do biogás por meio do método de deslocamento de fluido em proveta invertida contendo solução salina acidificada (pH 2,0) (WALKER et al., 2009). A composição do biogás produzido foi analisada por cromatografia gasosa de acordo com metodologia exposta por Santos et al. (2014b). Os limites de detecção ( $\mu\text{mol}$ ) para a análise da composição do biogás por cromatografia foram 0,902 para hidrogênio, 1,039 para metano e 0,474 para o dióxido de carbono. O volume de injeção de gás da amostra foi de 1 mL e o teor de hidrogênio ( $\% \text{H}_2$ )/metano ( $\% \text{CH}_4$ ) foi a quantidade de  $\text{H}_2/\text{CH}_4$  (expressa em moles), dividido pela quantidade total de todos os constituintes ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ ) (também expresso em moles).

#### 4.6 ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR

No final de cada condição operacional dos quatro reatores foram coletadas 50 g de amostras dos meios suporte. O meio suporte foi misturado a 100 mL de tampão PBS (8 g de NaCl L<sup>-1</sup>, 0,2 g de KCl L<sup>-1</sup>, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) e agitado com 50 g de esferas de vidro por 15 minutos. O líquido sobrenadante após a agitação foi centrifugado em 6000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi armazenada a -20 °C (~0,5 g de biomassa por reator por condição operacional). Após análise dos resultados de HY para o RALF-AT, e MY/remoção de matéria orgânica para os RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM ao final da operação dos quatro reatores foi selecionada a amostra da melhor condição operacional de cada reator para análise metagenômica.

O DNA genômico das amostras foi extraído usando o Fast DNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction (MP Biomedicals) seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do DNA extraído foi verificada em 0,8% de gel de agarose. O DNA extraído das amostras foi quantificado (ng/μL) e a análise de pureza foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) (relação 260/280 nm). O preparo de biblioteca de DNA com insertos curtos e o sequenciamento de DNA em plataforma Illumina (6G bases sequenciais, Paired End 2x150 bp, Q30 > 85%) foi realizado pela empresa Genone (Rio de Janeiro, RJ, Brasil, [www.genone.com.br](http://www.genone.com.br)).

As sequências adquiridas foram examinadas com a ferramenta *fastqc* para determinar a qualidade do sequenciamento. *Phred score 20* foi utilizado para filtrar leituras de baixa qualidade (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). A ferramenta *SqueezeMeta* (TAMAMES; PUENTE-SÁNCHEZ, 2019) foi empregada em conjunto com a ferramenta *MegaHit* (LI et al., 2015) para melhor montar *contigs* com comprimento mínimo de 150pb e K-mers 21, 29, 39, 59, 79, 99 e 119. *Bowtie2* (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) foi utilizado para mapear as leituras dos *contigs*, enquanto *Bedtools* (QUINLAN; HALL, 2010) foi usado para contar e cobrir as leituras em *contigs* para fins estatísticos. *Prodigal* (HYATT et al., 2010) foi utilizado para prever procariotos. As leituras foram alinhadas ao banco de dados KEGG utilizando o parâmetro LCA (*Lowest Common Ancestor*) (KANEHISA; GOTO, 2000; KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016) para anotação funcional e para o banco de dados *GenBank* (BENSON et al., 2013) para anotação taxonômica. No ambiente estatístico R, foi estabelecido um processo abrangente para exploração de dados usando o pacote *phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013). As sequências de sequenciamento foram depositadas no Arquivo Europeu de Nucleotídeos sob o ID do Projeto PRJEB47724 e ID da Amostra ERS7647951.

#### 4.7 ANÁLISE CINÉTICA

O modelo cinético utilizado para avaliar a performance dos RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM foi o *Stover–Kincannon* modificado (Equação (4.1)) (AHN; FORSTER, 2000):

$$\frac{dS}{dt} = \frac{U_{\max} \cdot (Q \cdot S_i / V)}{K_B + (Q \cdot S_i / V)} \quad (4.1)$$

Linearizando a Equação (4.1):

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)^{-1} = \frac{V}{Q(S_i - S_e)} = \frac{K_B}{U_{\max}} \cdot \frac{V}{Q \cdot S_i} + 1 \quad (4.2)$$

$$\frac{V}{Q(S_i - S_e)} = \frac{K_B}{U_{\max}} \left(\frac{1}{TCO}\right) + \frac{1}{U_{\max}} \quad (4.3)$$

em que  $dS/dt$  é a taxa de remoção de substrato ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ),  $U_{\max}$  é a taxa de utilização máxima de substrato ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ),  $K_B$  é a constante de saturação ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ),  $S_i$  é a concentração de matéria orgânica afluenta ( $\text{g DQO L}^{-1}$ ),  $S_e$  é a concentração de matéria orgânica efluente ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $Q$  é a vazão ( $\text{L d}^{-1}$ ) e  $V$  é o volume de trabalho dos reatores.

#### 4.8 CÁLCULOS DE INDICADORES DE DESEMPENHO

Neste item estão apresentadas as equações utilizadas nos cálculos de indicadores fundamentais de resposta dos reatores a serem discutidos no item 5. Os indicadores de resposta são: conversão de substrato (matéria orgânica, carboidrato, HLa, glicerina) (Equação (4.4)); PVH por volume de reator (Equação (4.5)); PVH por volume de leite (Equação (4.6)), o HY (Equação (4.7)),  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  (Equação (4.8)), PVM por volume de reator (Equação (4.9)), PVM

por volume de leite (Equação (4.10)), MY (Equação (4.11)) e balanço de DQO (Equação (4.12)).

$$\text{Convers\~{a}o/Remo\~{c}o\~{a}o de substrato (\%)} = \frac{[\text{Substrato afluyente}] - [\text{Substrato efluente}]}{[\text{Substrato afluyente}]} \times 100 \quad (4.4)$$

O termo convers\~{a}o de substrato \u00e9 utilizado para carboidrato, glicerol e HLa na etapa de acidog\u00eaneose, uma vez que, o substrato \u00e9 apenas convertido em AGV, e n\u00e3o completamente removido do sistema. O termo remo\~{c}o\~{a}o de substrato \u00e9 utilizado para mat\u00e9ria org\u00e2nica (expressa em DQO). Portanto, [Substrato afluyente] \u00e9 a concentra\~{c}o\~{a}o de mat\u00e9ria org\u00e2nica (g DQO L<sup>-1</sup>), carboidrato (g L<sup>-1</sup>), HLa (g L<sup>-1</sup>) e glicerina (g L<sup>-1</sup>) na alimenta\~{c}o\~{a}o dos reatores. [Substrato efluente] de mat\u00e9ria org\u00e2nica (g DQO L<sup>-1</sup>), carboidrato (g L<sup>-1</sup>), HLa (g L<sup>-1</sup>) e glicerina (g L<sup>-1</sup>) no efluente dos reatores.

Os c\u00e1lculos de produ\~{c}o\~{a}o de hidrog\u00eancio s\u00e3o realizados a partir dos dados de composi\~{c}o\~{a}o do biog\u00e1s e produ\~{c}o\~{a}o volum\u00e9trica de biog\u00e1s. Neste caso, o volume total de biog\u00e1s produzido \u00e9 multiplicado pelo %H<sub>2</sub> resultando no volume de H<sub>2</sub> gerado. Se o volume total de biog\u00e1s computado \u00e9 expresso em dados di\u00e1rios, ent\u00e3o o volume de H<sub>2</sub> ser\u00e1 expresso em mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup>. Duas formas de apresentar o volume di\u00e1rio de hidrog\u00eancio produzido \u00e9 a PVH<sub>reator</sub> (Equa\~{c}o\~{a}o (4.5)), no qual o volume di\u00e1rio de H<sub>2</sub> produzido \u00e9 apresentado em rela\~{c}o\~{a}o ao volume total de reator (1,55 L), e PVH<sub>leito</sub> (Equa\~{c}o\~{a}o (4.6)). A PVH<sub>leito</sub> \u00e9 utilizada para comparar a performance de produ\~{c}o\~{a}o de H<sub>2</sub> entre RALFs, uma vez que, nesta forma de apresentar os dados o volume di\u00e1rio de H<sub>2</sub> \u00e9 dividido pelo volume de leite fluidificado.

$$\text{PVH}_{\text{reator}} \text{ (mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}) = \frac{\frac{\text{Volume de H}_2 \text{ (mL H}_2\text{)}}{\text{tempo (d)}}}{\text{Volume de reator (L)}} \quad (4.5)$$

$$\text{PVH}_{\text{leito}} \text{ (mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}) = \frac{\frac{\text{Volume de H}_2 \text{ (mL H}_2\text{)}}{\text{tempo (d)}}}{\text{Volume de leite (L)}} \quad (4.6)$$

O parâmetro que relaciona a produção de hidrogênio com a concentração de substrato adicionada é o HY (Equação (4.7)), que pode ser expresso em função de substrato convertido ou de matéria orgânica adicionada (DQO<sub>aplicada</sub>). No caso da fermentação escura de vinhaça, a unidade de HY é frequentemente apresentada em função da concentração de matéria orgânica aplicada (SANTOS et al., 2014a, 2014b, 2014c; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019; FERREIRA et al., 2020; REGO et al., 2020; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021). Isto ocorre porque a vinhaça tem composição variada, com proporções similares de carboidratos, glicerol e HLa (FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019), o que dificultaria expressar a produção de hidrogênio em função de um só substrato. Similarmente, a adição de mais de um substrato em co-fermentação dificulta a atribuição do volume de H<sub>2</sub> produzido às rotas de conversão de somente um composto.

$$HY \text{ (mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}) = \frac{\text{Volume de H}_2 \text{ (mmol H}_2\text{)}}{\text{Concentração de substratos afluente (DQO}_{\text{aplicada}})} \quad (4.7)$$

Diferentemente do HY, que em sistemas de co-fermentação é apresentado por concentração de matéria orgânica adicionada, o Y<sub>1,3-PDO</sub> pode ser apresentado em função do glicerol convertido (Equação (4.8)). Isto é possível porque a obtenção de 1,3-PDO por fermentação escura é possível ao utilizar glicerol como substrato orgânico.

$$Y_{1,3\text{-PDO}} \text{ (mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol)} = \frac{\text{Concentração de 1,3-PDO (mol 1,3-PDO L}^{-1}\text{)}}{\text{Glicerol afluente - efluente (mol glicerol L}^{-1}\text{)}} \quad (4.8)$$

Os cálculos de produção de metano são realizados de maneira similar aos cálculos de produção de hidrogênio, ou seja, a partir dos dados de composição do biogás (%CH<sub>4</sub>) e produção volumétrica de biogás, e resulta em volume de CH<sub>4</sub> em L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>. Enquanto a PVM<sub>reator</sub> (Equação (4.9)) relaciona o volume diário de CH<sub>4</sub> produzido ao volume total dos

RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM (1,55 L), a  $PVH_{\text{leito}}$  (Equação (4.10)) relaciona o volume diário produzido ao volume de leito fluidificado. Por sua vez, o MY (Equação (4.11)) é calculado por matéria orgânica removida do reator. Antes do cálculo de MY o volume de  $CH_4$  é corrigido de 25 °C no RALF-SM e 55 °C nos RALF-ST e RALF-MT para condições normais de temperatura e pressão (CNTP), ou seja, 0 °C e 1 atm.

$$PVM_{\text{reator}} (\text{L } CH_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}) = \frac{\text{Volume de } CH_4 (\text{L } CH_4)}{\text{tempo (d)}} \cdot \frac{1}{\text{Volume de reator (L)}} \quad (4.9)$$

$$PVM_{\text{leito}} (\text{L } CH_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}) = \frac{\text{Volume de } CH_4 (\text{L } CH_4)}{\text{tempo (d)}} \cdot \frac{1}{\text{Volume de leito (L)}} \quad (4.10)$$

$$MY (\text{mL } H_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}) = \frac{\text{Volume de } CH_4 (\text{mL } CH_4)}{\text{Concentração de DQO afluente - efluente (DQO}_{\text{aplicada}})} \quad (4.11)$$

O balanço de matéria orgânica (DQO) dos reatores (Equação (4.12)) é calculado convertendo todos os metabólitos líquidos e gasosos, concentração de SSV e substratos não-convertidos e detectados no efluente para DQO. A conversão dos compostos para DQO é realizada por meio da multiplicação da concentração do composto pela sua DQO equivalente (Tabela 14). O balanço de todos os reatores é apresentado em ANEXO A.

$$\text{Balanço (\%)} = \frac{\text{DQO}_{\text{aplicada}} - \Sigma (\text{H}_2, \text{CH}_4, \text{AGV}, \text{SSV}, \text{glicerol}, \text{carboidrato})}{\text{DQO}_{\text{aplicada}}} * 100 \quad (4.12)$$

Tabela 14. Valores utilizados na conversão da concentração dos compostos para g DQO L<sup>-1</sup>

Componente	DQO equivalente (g DQO g <sup>-1</sup> composto)
HFo	0,3478
HAc	1,0667
HPr	1,5135
HLa	1,0657
HBu	1,8182
HIsBu	1,8182
HVa	2,0392
HIsVa	2,0392
HSu	0,9492
HCa	2,2069
MeOH	1,5000
EtOH	2,0869
1,3-PDO	1,6842
BuOH	2,5946
H <sub>2</sub>	8
CH <sub>4</sub>	4
Glicerol	1,2174
Sacarose <sup>a</sup>	1,1228

<sup>a</sup> considerando que o principal carboidrato da vinhaça é sacarose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados de desempenho do RALF na co-digestão de glicerina e vinhaça de cana-de-açúcar em: sistema de estágio único termofílico (55 °C – 65 °C); sistema de estágio duplo com RALF acidogênico termofílico (55 °C – 65 °C) seguido de dois RALF metanogênicos operados sob condição mesofílica (25 °C) e termofílica (55 °C – 65 °C). Como parâmetros de avaliação de desempenho foram verificados os valores de pH, alcalinidade a bicarbonato, remoção de carboidratos totais (base em sacarose), remoção de glicerina, remoção de matéria orgânica (DQO), PVH no RALF-AT, PVM nos RALF-MT/ST/SM, HY no RALF-AT e MY no RALF-MT/ST/SM. O desempenho dos reatores acidogênico e metanogênicos também foram avaliados de acordo com a produção de metabólitos solúveis. Em condições determinadas com base da literatura e dos resultados do presente estudo foram analisados os perfis das comunidades microbianas e as distribuições das funções metabólicas nos reatores. Nesta seção está apresentada também uma discussão comparativa entre os dois sistemas, estágio único e estágio duplo, que visa determinar a partir dos dados obtidos na digestão de vinhaça e glicerina (50%: 50% base em DQO) em RALF a melhor tecnologia a ser empregada na recuperação de energia a partir da co-digestão desses resíduos.

### 5.1 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM ESTÁGIO ÚNICO: RALF-MT

Inicialmente foi avaliado o efeito do aumento lento da concentração de cossustratos de 2 para 15 g DQO L<sup>-1</sup> na produção contínua de metano a partir de vinhaça e glicerina em estágio único com temperatura fixa em 55 °C e TDH fixo em 24 h. Em uma segunda inoculação do RALF-MT termofílico (55 °C) foi realizado o aumento rápido e escalonado da concentração de cossustratos de 2 para 5; 7,5; 10 e 15 g DQO L<sup>-1</sup> com reator operado em modo batelada. Após abertura do reator de partida rápida para operação em modo contínuo e ao observar que o MY e remoção de DQO do reator operado em 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> se igualou aos valores do reator operado com aumento lento e escalonado da concentração, foi realizado aumento da TCO para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.



### 5.1.1 Efeito do aumento da TCO no desempenho do RALF-MT

#### 5.1.1.1 Aumento lento e escalonado da concentração de cossustratos em reator contínuo

Na Figura 14 estão apresentadas as eficiências de remoção de glicerina, carboidratos e matéria orgânica (DQO) em função das TCOs aplicadas ao RALF-MT submetido ao aumento lento das concentrações de cossustratos. As remoções de glicerina no reator permaneceram constantes e superiores a 95% em todas as TCO aplicadas. Por sua vez, foi observado aumento de  $73,8 \pm 12,4\%$  para  $88,8 \pm 6,7\%$  na remoção de carboidratos com o acréscimo da TCO de 2 para 5 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ , permanecendo constante em  $85,6 \pm 4,8\%$  na TCO de 7,5 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ . No entanto, ao incrementar a TCO para 10 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  foi observada redução da remoção de carboidratos para  $45,9 \pm 12,9\%$ . O mesmo comportamento da conversão de carboidratos foi observado em relação à eficiência de remoção de matéria orgânica, equivalente à  $79,4 \pm 9,0\%$ ,  $92,1 \pm 3,9\%$ ,  $92,4 \pm 2,0\%$  e  $75,5 \pm 6,2\%$  para as TCO aplicadas de 2,0 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ , 5,0 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ , 7,5 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  e 10,0 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ , respectivamente.

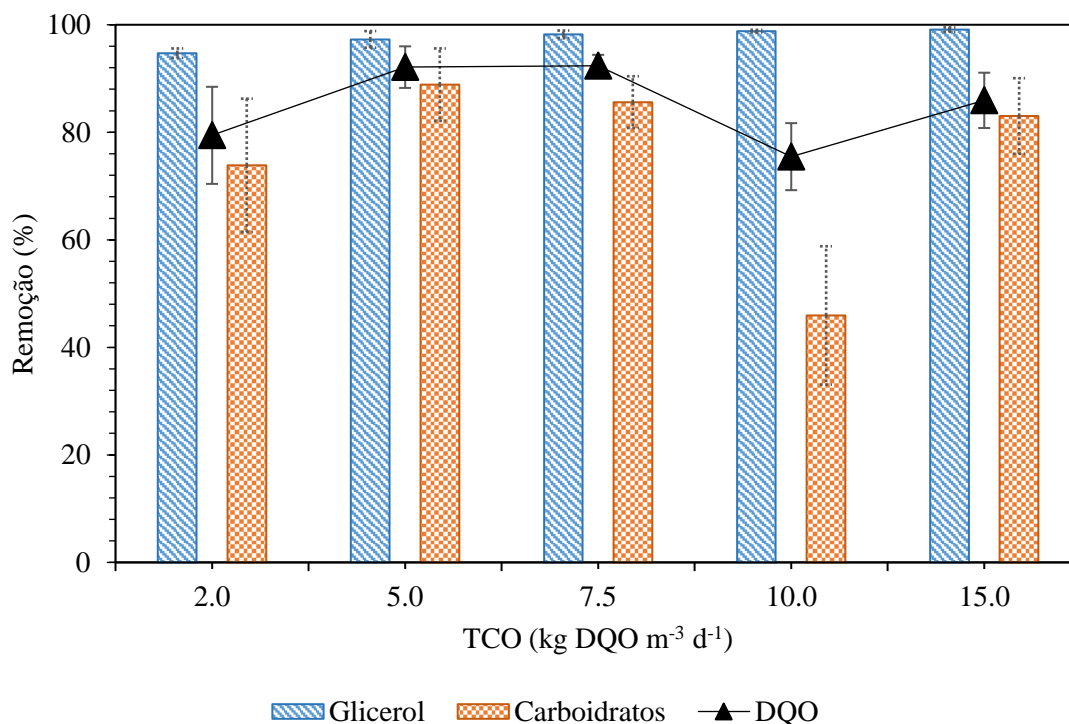


Figura 14. Efeito do aumento lento e escalonado da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-MT

As reduções das eficiências de remoção de carboidratos e matéria orgânica ao operar o RALF-MT em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  podem estar relacionadas aos lotes de vinhaça utilizados (Tabela 9). Enquanto nas demais etapas de operação foram utilizados lotes de vinhaça com DQO aproximada de  $30 \text{ g DQO L}^{-1}$ , na Etapa 4 ( $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  e  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foi utilizada vinhaça concentrada com DQO aproximada de  $112 \text{ g DQO L}^{-1}$ . A utilização de variados lotes de vinhaça e a alteração da qualidade da vinhaça são fatores previstos na digestão anaeróbia deste substrato (RAMOS et al., 2021). A qualidade da vinhaça varia de acordo com a cana-de-açúcar utilizada (método de plantio, qualidade do solo, e época do ano), o processo de produção do EtOH, a configuração da usina produtora de EtOH (destilarias autônomas ou plantas anexas) e em casos de plantas anexas a qualidade da vinhaça depende da origem do mosto (caldo, melaço ou caldo e melaço) (PANT; ADHOLEYA, 2007).

A aplicação de vinhaça concentrada pode ter sido prejudicial a digestão anaeróbia no RALF-MT devido à sua elevada razão DQO:N ( $243$  contra  $30 - 90$  para a vinhaça fresca), baixa concentração de fósforo ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) e elevada relação DQO/carboidratos ( $12 \text{ mg DQO mg}^{-1}$  carboidratos totais). A relação DQO/carboidratos da vinhaça aplicada em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi similar à relação DQO/carboidratos da vinhaça aplicada em  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $11 \text{ mg DQO mg}^{-1}$  carboidratos totais) e coincidiu com os menores valores de remoção de carboidratos nessas etapas (Figura 14). Além disso, apesar do aumento do carbono na mistura ser um dos motivos para aplicação da glicerina como cossustrato na digestão anaeróbia em casos de baixa razão DQO:N ( $< 60$ ) (BERNAT et al., 2021), no caso da vinhaça concentrada utilizada na Etapa 4, os efeitos prejudiciais da elevada razão DQO:N da própria vinhaça podem ter sido potencializados pela adição de glicerina. Essa ocorrência fica evidente ao constatar que não ocorreu inibição da digestão pelo aumento da TCO no RALF-MT. O aumento da concentração de cossustratos para  $15 \text{ g DQO L}^{-1}$  e aplicação de vinhaça fresca ocasionou no aumento das eficiências de remoção de carboidratos e matéria orgânica para  $83,0 \pm 7,0\%$  e  $85,9 \pm 5,1\%$ , respectivamente.

Os valores médios de MY em estado estacionário do RALF-MT foram acrescidos de  $170 \pm 17$  para  $264 \pm 13 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  ao aumentar a TCO de  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Figura 15). Esta ocorrência pode ser associada ao aumento da disponibilidade de substrato no reator, uma vez que, o sistema tem um requerimento mínimo de matéria orgânica para produção de metano (ALBANEZ et al., 2016a). Caillet e Adelard (2021) avaliaram o efeito do aumento da TCO de  $0,45$  para  $1,51 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  na produção de metano em digestor semi-contínuo mesofílico ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e observaram MY máximo igual a  $179 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  na máxima TCO aplicada. O MY observado por Caillet e Adelard

(2021) em  $1,51 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $179 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ) foi similar ao observado no RALF-MT em  $2,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $170 \pm \text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ), provando que a baixa carga pode de fato ser prejudicial à produção de metano.

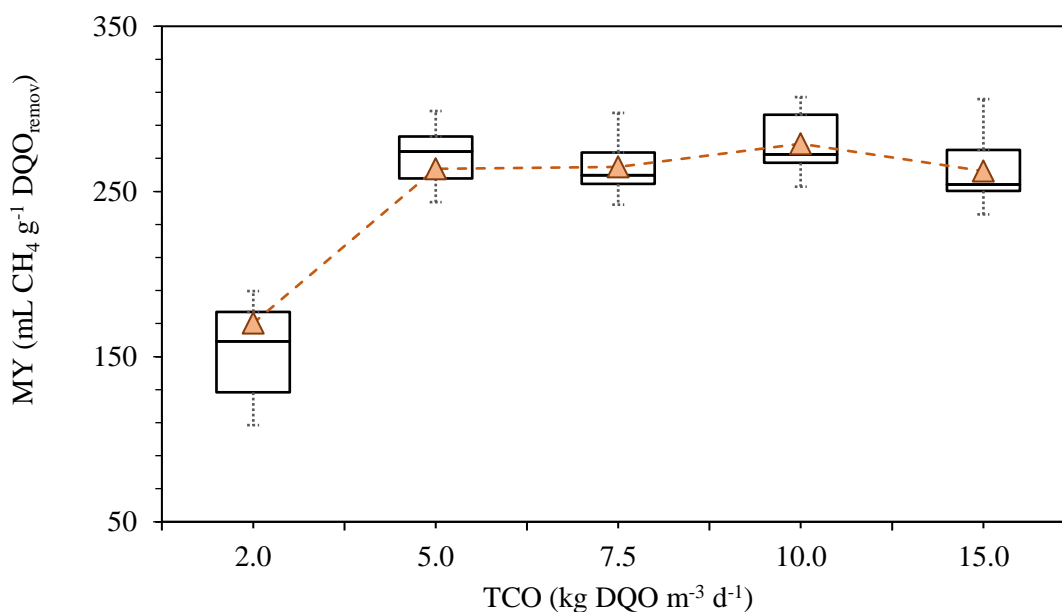


Figura 15. Efeito do aumento lento e escalonado da TCO no MY do RALF-MT

Os valores médios de MY em estado estacionário permaneceram estáveis entre 262 e 279  $\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  para TCOs entre 5 e 15  $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Apesar de redução da eficiência de remoção de matéria orgânica em 10  $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , não foram observadas oscilações na produção de metano. Esta estabilidade no MY é evidenciada ao observar baixo desvio padrão da média nesta condição operacional (Figura 15). Os maiores valores de MY ( $\sim 307 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ) foram observados nas TCOs de 10 e 15  $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Os valores de MY observados no RALF-MT em co-digestão termofílica de vinhaça e glicerina estão dentro da faixa de 234 a 300  $\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  reportada na literatura para monodigestão termofílica de vinhaça de cana-de-açúcar (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016; BARROS et al., 2017; RAMOS; SILVA, 2020; RAMOS et al., 2021). Além disso, o desempenho do RALF-MT quanto ao MY permaneceu estável em TCOs superiores às aplicadas em monodigestão de glicerol (T.B. COSTA et al., 2021). O efeito do aumento da TCO na remoção dos cossustratos, na PVM e no MY será discutido no subitem 5.1.1.3.

### *5.1.1.2 Aumento rápido da concentração de cossustratos em modo batelada*

Na inoculação 2 do RALF-MT o aumento da concentração de cossustratos de 2 para 15 g DQO L<sup>-1</sup> foi realizado em modo batelada alimentada ao observar eficiência de remoção de matéria orgânica superior a 80% e relação AI/AP inferior a 0,5 no reator. Os valores de remoção de glicerol superiores a 95% foram observados após 24 horas das alimentações em cada concentração. Similarmente, o HLa afluyente oriundo da vinhaça foi inteiramente removido após 48 horas das alimentações em cada concentração. Entretanto, foram necessárias 72 horas para atingir 80% da remoção do carboidrato adicionado para concentração de cossustratos de 5 a 15 g DQO L<sup>-1</sup>. Enquanto, para 2 g DQO L<sup>-1</sup> a conversão de carboidratos foi inferior a 60%. Então, apesar do lodo utilizado na partida do RALF-MT ser oriundo da digestão termofílica de vinhaça em UASB, os microrganismos apresentaram preferência pela conversão de glicerina. Esta ocorrência pode estar associada ao fato de o glicerol entrar na célula por transporte passivo (MEIER et al., 2020a) e, portanto, ser um meio de obtenção de energia mais rápido do que a fermentação primária de compostos complexos da vinhaça. Além disso, os microrganismos presentes no lodo da usina São Martinho são adaptados ao glicerol, uma vez que, este é um dos componentes da vinhaça (Tabela 9).

Para consumo de 80% da matéria orgânica adicionada o reator permaneceu por 6, 15, 18, 16 e 21 dias em 2; 5; 7,5; 10 e 15 g DQO L<sup>-1</sup>, respectivamente. O aumento do tempo necessário para a remoção de matéria orgânica ao aumentar a concentração de cossustratos é esperado e está relacionado à necessidade de aumento da concentração de microrganismos. Isto porque o aumento da concentração de cossustratos leva ao aumento da produção de AGV. Por sua vez, o aumento da concentração de AGV é associado à necessidade de tempo para os microrganismos que realizam a fermentação secundária, de reprodução mais lenta, se adaptarem à nova condição (ZHANG et al., 2008). No caso do RALF-MT, o aumento e acúmulo potencialmente danoso da concentração de AGV foi utilizado como critério para transferência de regime de operação para modo contínuo em 15 g DQO L<sup>-1</sup>.

O RALF-MT foi operado em modo contínuo com concentração de cossustratos igual a 15 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH de 24 h. Foram necessários 49 dias para que a eficiência de remoção de matéria orgânica (Figura 16), inicialmente em 53,6%, se igualasse à observada em 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> no aumento lento da concentração de cossustratos (85,9%). Similarmente, Caillet e Adelard (2021) avaliaram a estratégia de partida de digestor semi-contínuo mesofílico (37 °C) alimentado com vinhaça e observaram eficiência de remoção de matéria orgânica de 51% durante a partida e de 84% em estado estacionário. Porém, a maior diferença entre as

performances do digestor semi-contínuo e do RALF-MT é que no primeiro as TCOs aplicadas permaneceram entre 0,45 e 1,51 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, dez vezes menor do que à aplicada no RALF-MT. Caillet e Adelard (2021) relacionaram a performance do digestor semi-contínuo às suas condições de mistura, visto que, a alteração de agitação contínua para mínima agitação resultou em aumento da eficiência de remoção de matéria orgânica de 49% para 68%. De fato, Yeshanew et al. (2016) apontaram que a intensa mistura no RALF pode ter sido responsável por redução da performance do reator alimentado com glicose. Os autores indicaram que a vazão de recirculação igual a 7,5 L h<sup>-1</sup> pode resultar em contato eficiente entre biomassa e substrato sem que as forças de cisalhamento provoquem stress aos microrganismos. Porém, a boa performance do RALF-MT ocorreu em vazão de recirculação igual a 56 L h<sup>-1</sup>.

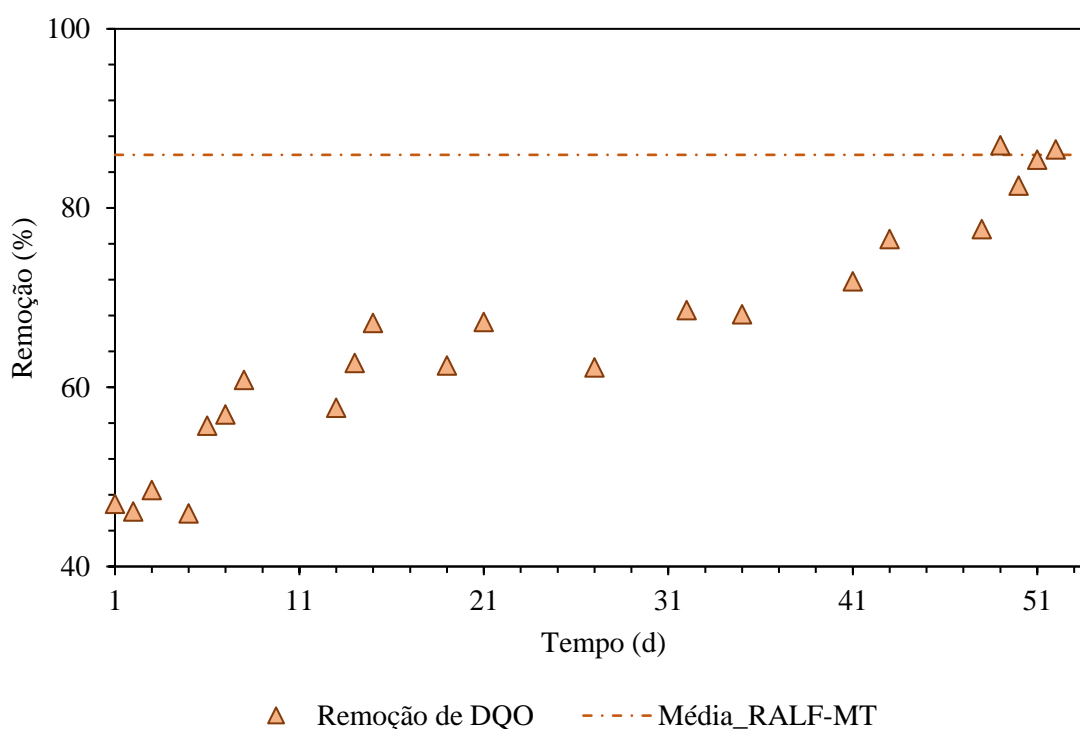


Figura 16. Média dos valores diários de remoção de DQO do RALF-MT após inoculação 2 ( $\Delta$ ) comparada à média do RALF-MT após inoculação 1 (-.-.-.-)

No RALF-MT o crescimento não foi limitado pelas forças de cisalhamento, como foi previamente observado por Hsu e Shieh (1993). Neste caso em particular, o aumento progressivo e rápido da concentração de cossustratos resultou em aumento da concentração de biomassa no reator, visualizado por meio do consumo eficiente de matéria orgânica em modo batelada. As condições adversas de mistura e aumento de concentração podem ter levado à geração de exopolímeros e adiantado a fixação irreversível das células no biofilme (MICHAUD

et al., 2002). O adiantamento da fixação irreversível do biofilme também pode ter sido possibilitado pela aplicação de biomassa adaptada aos substratos e à temperatura de operação. Por outro lado, a baixa eficiência de remoção de matéria orgânica no início da operação em modo contínuo (Figura 16) pode ser associada à elevada concentração de SSV nas amostras de efluente do reator (Figura 17), uma vez que, a análise de DQO (total) foi realizada com a amostra sem nenhum processo adicional de centrifugação ou filtração. Isto ocorre porque na operação em modo batelada alguns microrganismos crescem em suspensão (YESHANEW et al., 2016). Então, a conversão do regime de operação para modo contínuo pode resultar em lavagem da biomassa suspensa em TDH de 24 h. Porém, o amadurecimento do biofilme é evidenciado pela capacidade de recuperação do reator quanto à eficiência de remoção de matéria orgânica.

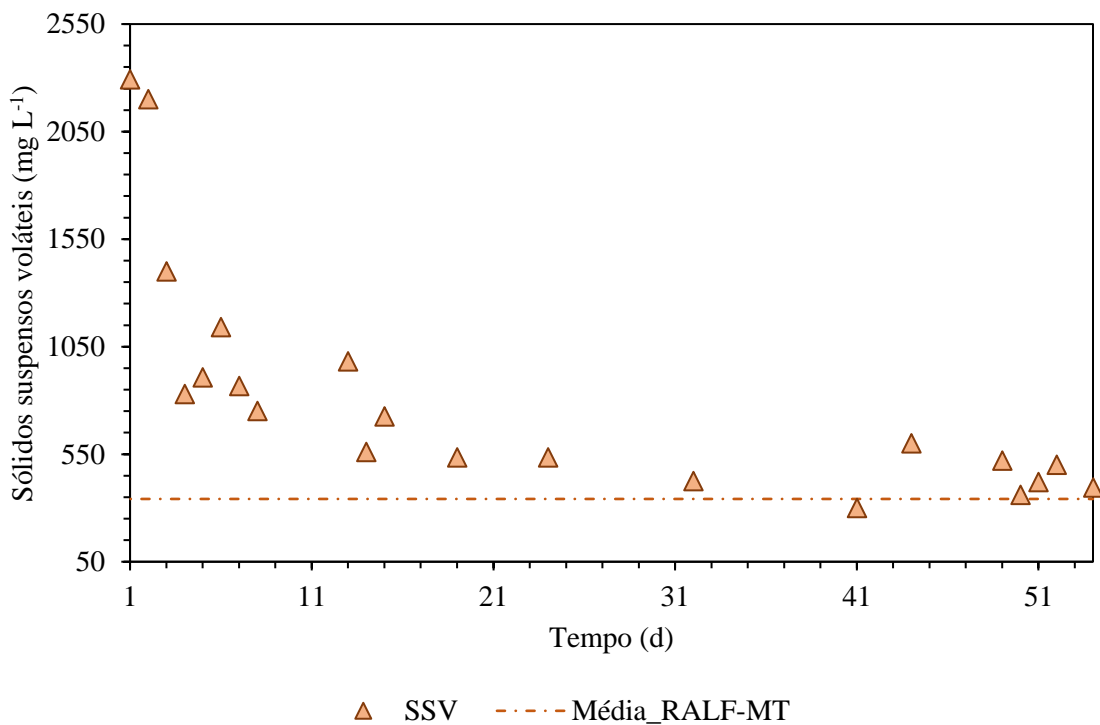


Figura 17. Média dos valores diários de SSV do RALF-MT após inoculação 2 ( $\Delta$ ) comparada à média do RALF-MT após inoculação 1 (---)

As hipóteses levantadas podem ser confirmadas pela produtividade de metano no RALF-MT (Figura 18). Por meio dos valores médios de MY é possível observar que o reator permaneceu estável em operação contínua, cumprindo um dos pré-requisitos que indicam sucesso da estratégia de partida (MICHAUD et al., 2002; AHMED; RODRÍGUEZ, 2020). Em contrapartida, o decréscimo do MY no início da operação em modo contínuo pode estar

relacionado à lavagem da biomassa suspensa do reator. Como a reposição da biomassa lavada leva ao consumo de matéria orgânica (anabolismo), a síntese celular compete pelo substrato com as vias de produção de ácidos e, conseqüentemente, metano (MICHAUD et al., 2002; YESHANEW et al., 2016). O posterior aumento do MY após o quarto até o vigésimo primeiro dia de operação em modo contínuo pode ser o resultado da alteração fisiológica do biofilme após a lavagem (HASSAN et al., 2014). Além disso, os valores de MY próximos ao teórico ( $350 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ) podem ser indicativo de liberação de exopolímeros no efluente do reator devido à sua produção excessiva neste período de reposição massiva de biomassa. de Albuquerque et al. (2019) avaliaram a estratégia de partida de AnSBBR termofílico alimentado com vinhaça e associaram valores de MY máximo superiores ao teórico devido à matéria orgânica (exopolímeros) indevidamente contabilizada nas análises de DQO das amostras de efluente.

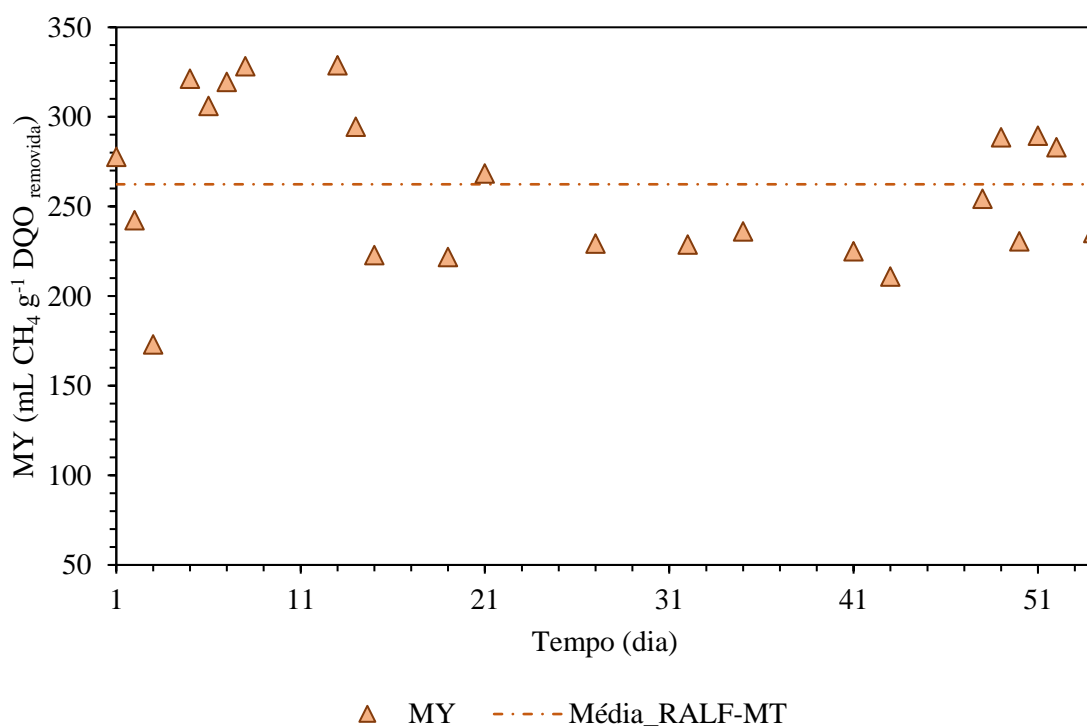


Figura 18. Média dos valores diários de MY do RALF-MT após inoculação 2 ( $\Delta$ ) comparada à média do RALF-MT após inoculação 1 (---)

É válido mencionar que o RALF-MT, que foi alimentado com vinhaça e glicerol como cossustratos, apresentou performance superior em TDH de 24 h ( $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) do que a observada na digestão de glicerol como mono-substrato em RALF termofílico no mesmo TDH (COSTA, 2017). Costa (2017) realizou aumento escalonado da concentração de glicerol

de 2 para 7,5 g DQO L<sup>-1</sup> em RALF termofílico operado em modo batelada, seguido da operação em modo contínuo (10 g DQO L<sup>-1</sup> e 36 h). O aumento da TCO pela redução do TDH no estudo de Costa (2017) levou ao decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica de 49% em 36 h para 19% em 24 h, inferiores as observadas no RALF-MT. Estes resultados podem ser associados ao aumento da TCO pelo aumento da concentração de cossustratos no RALF-MT e à utilização de vinhaça como cossustrato. Estas afirmações podem ser mais bem embasadas ao observar o efeito do aumento da TCO no RALF-MT operado em modo contínuo.

### *5.1.1.3 Desempenho geral do RALF-MT*

Na Tabela 15 estão apresentadas concentrações de glicerina, carboidratos totais e matéria orgânica nas amostras de afluente e efluente do RALF-MT em TCO acrescida de 2 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Na Figura 19 pode ser visualizado o efeito do aumento da TCO de 2 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> nas eficiências de remoção de glicerina, carboidratos e matéria orgânica no RALF-MT.

Em todas as TCOs aplicadas foi observada maior eficiência de remoção de glicerina em relação à de carboidratos (Figura 19), mesmo com maior concentração de glicerina afluente ao RALF-MT em todas as condições operacionais (Tabela 15). As eficiências de remoção de glicerina no RALF-MT foram similares às reportadas por T.B. Costa et al. (2021) e Zhang et al. (2015). Zhang et al. (2015) realizaram a digestão anaeróbia de GR em CSTR sob condição hipertermofílica (70 °C) e observaram remoções de glicerol estáveis e superiores à 90% para as concentrações acrescidas de 5, 9 para 13 g L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 5,5 dias. Na operação de RALF termofílico (55 °C) em TDH fixo de 24 h, T.B. Costa et al. (2021) observaram valores de remoção de glicerol superiores a 96% para a TCO acrescida de 1,2 a 7,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. A glicerina contém carbono em estado altamente reduzido e de elevada biodegradabilidade (MARU et al., 2012; VIANA et al., 2012). Portanto, as conversões superiores de glicerina em relação às conversões do carboidrato presente na vinhaça é um resultado esperado. Lovato et al. (2019a) realizaram a co-digestão de vinhaça e glicerina (50%: 50%) em ASBR (30 °C) com TCO aplicada de 10,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e observaram remoção de glicerina de 99,7%, superior à remoção de carboidratos (90%).



Tabela 15. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais, glicerina e DQO em função da TCO aplicada ao RALF-MT

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>C<sub>aflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>efflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glic<sub>aflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glic<sub>efflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DQO<sub>aflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DQO<sub>efflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
1	2,0	122 ± 51	29 ± 13	888 ± 103	47 ± 6	2110 ± 260	435 ± 53
2	5,0	326 ± 112	37 ± 13	2408 ± 559	65 ± 15	4888 ± 508	386 ± 40
3	7,5	356 ± 131	51 ± 19	3752 ± 147	68 ± 3	7990 ± 569	607 ± 43
4	10,0	265 ± 61	143 ± 33	5428 ± 727	65 ± 9	10783 ± 1243	2642 ± 305
5	15,0	1023 ± 449	144 ± 49	9109 ± 1363	80 ± 30	16849 ± 2624	2354 ± 729
6	15,0	960 ± 81	130 ± 38	8352 ± 1389	78 ± 6	15149 ± 1166	2170 ± 154
7	20,0	2304 ± 398	196 ± 17	10368 ± 1079	96 ± 10	22101 ± 2127	4746 ± 876

TCO: taxa de carregamento orgânico; C<sub>aflu/efflu</sub>: concentração de carboidratos afluente/efluente; Glic<sub>aflu/efflu</sub>: concentração de glicerol afluente/efluente; DQO<sub>aflu/efflu</sub>: demanda química de oxigênio afluente/efluente.

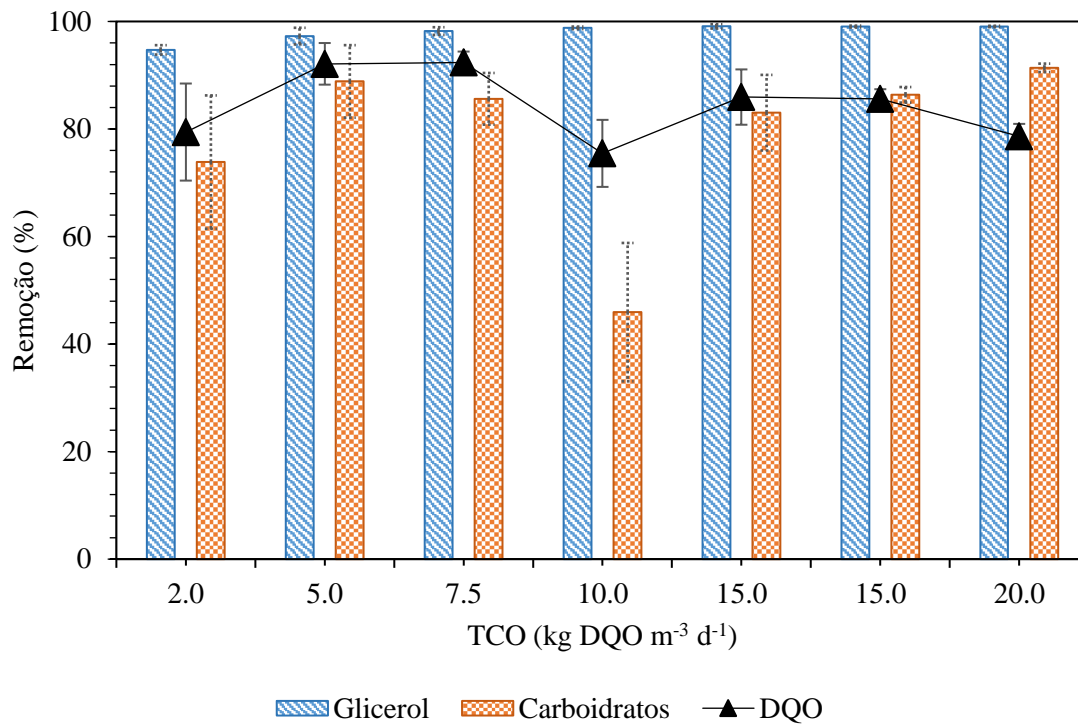


Figura 19. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-MT

As eficiências de conversão de carboidratos, glicerina e matéria orgânica em estado estacionário ao aplicar 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> após inoculação 1 e inoculação 2 foram similares. Então, analisando estas respostas é possível atestar que a co-digestão de vinhaça e glicerina em RALF foi reprodutível. O aumento da TCO de 15 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> a partir da inoculação 2 não acarretou alterações significativas nas remoções de carboidratos e glicerina. A eficiência de remoção de carboidratos permaneceu em 86,4% e 91,4% ao aplicar 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> no RALF-MT, respectivamente. A estabilidade após partida rápida do RALF-MT pode ser associada à co-digestão de vinhaça e glicerol. Isto porque na mono-digestão de vinhaça em reator UASB foi observada eficiência de remoção de matéria orgânica inferior a 60% atribuída ao aumento rápido da TCO de 8 para 45 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> durante 160 dias de operação (BARROS et al., 2017). Em contrapartida, a mono-digestão de vinhaça também em reator UASB resultou em eficiências de remoção de matéria orgânica igual a 87,5% no estudo de Del Nery et al. (2018). Enquanto Barros et al. (2017) realizaram aumento rápido da TCO, Del Nery et al. (2018) incrementaram a TCO em passos 0,3 até atingir 30,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Enquanto a eficiência de remoção de carboidratos permaneceu estável no RALF-MT (Figura 17), na digestão de vinhaça como mono-substrato em RALF termofílico foi observada redução da eficiência de remoção de carboidratos de 91% para 75% ao aumentar a TCO de 15

para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (RAMOS et al., 2021). A redução da eficiência de remoção de carboidratos no estudo de Ramos et al. (2021) foi reflexo da redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 79% para 44% devido à sobrecarga do reator ao aumentar a TCO de 1 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. No caso do RALF-MT, foi observada redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 85,6% para 78,6% ao aumentar a TCO de 15 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Porém, o desempenho quanto à remoção de matéria orgânica no RALF-MT foi superior ao observado por Ramos et al. (2021) em todas as TCOs aplicadas.

O desempenho do RALF-MT quanto à remoção de matéria orgânica também foi superior ao observado na digestão de glicerol em RALF termofílico. T.B. Costa et al. (2021) observaram redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 94,2% para 67,7% ao incrementar a TCO de 1,2 para 6,8 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. A TCO em que foi observada redução da eficiência de remoção de matéria orgânica na mono-digestão termofílica de glicerol (T.B. COSTA et al., 2021) foi 2-vezes e 3-vezes menor do que as observadas em mono-digestão de vinhaça (RAMOS et al., 2021) e co-digestão de vinhaça e glicerol, respectivamente. T.B. Costa et al. (2021) justificaram que a redução da eficiência ocorreu devido ao acúmulo de AGV na digestão de glicerol. De fato, Bezerra et al. (2011) observaram redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 91% para 47,2% em mono-digestão de glicerol em AnSBBR acompanhada pelo aumento da concentração e AGV para 729 mg HAc L<sup>-1</sup> ao incrementar a TCO de 1,5 para 6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Em contrapartida, de Albuquerque et al. (2019) também utilizaram AnSBBR para mono-digestão de vinhaça e observaram concentração de AGV igual a 92 mg HAc L<sup>-1</sup> em 6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, inferior ao acúmulo observado em mono-digestão de glicerol (BEZERRA et al., 2011).

A possibilidade de aplicação de TCOs mais elevadas na digestão de vinhaça (DE ALBUQUERQUE et al., 2019; RAMOS et al., 2021) vem do fato de que este é um composto misto de açúcares biodegradáveis e outros compostos com degradação mais lenta. O HLa presente na vinhaça, por exemplo, necessita de 8 h a mais para ser degradado do que o acetato (PAUDEL et al., 2017). A glicose também apresenta uma taxa de degradação maior do que o glicerol oriundo da vinhaça por ter elevada afinidade com o sistema de fosfotransferase (SAWASDEE; HAOSAGUL; PISUTPAISAL, 2019). Por outro lado, compostos fenólicos e aminoácidos exigem maior número de enzimas e maior tempo para degradação. Então, no caso da vinhaça, os diferentes tempos de degradação entre os constituintes podem prevenir acúmulo de AGVs e consequente inibição da biomassa do reator por este acúmulo.

Como foi previamente mencionado, a glicerina é prontamente assimilada pelos microrganismos (MEIER et al., 2020a). Neste caso, a eficiência de remoção de matéria orgânica

é reduzida ao aumentar a TCO devido ao acúmulo de AGV (PHUKINGNGAM et al., 2011). Já no caso da vinhaça, a redução da performance quanto à remoção de matéria orgânica ao aumentar a TCO para valores superiores a  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ocorre devido a maior entrada de compostos recalcitrantes no reator. Por este motivo a co-digestão de vinhaça e glicerina no RALF-MT permitiu a aplicação de TCOs mais elevadas quando comparada as digestões de vinhaça (RAMOS et al., 2021) e glicerina (T.B. COSTA et al., 2021), uma vez que, leva a redução da contribuição de compostos recalcitrantes da vinhaça. Adicionalmente, a composição da vinhaça contribui para os diferentes tempos de degradação que previnem o acúmulo de AVG em TCOs elevadas. Lovato et al. (2019a) realizaram co-digestão de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50%) em AnSBBR e observaram concentração de AGV igual a  $580 \text{ mg HAc L}^{-1}$  em  $7,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , ou seja, inferior a observada por Bezerra et al. (2011) em mono-digestão de glicerol ( $6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) em AnSBBR ( $729 \text{ mg HAc L}^{-1}$ ).

Na Tabela 16 é possível observar a concentração de AGV e a relação AI/AP no efluente do RALF-MT em função da TCO aplicada. O pH afluente do RALF-MT foi mantido entre 6,3 e 6,9 pela adição de  $0,10 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$  para TCO até  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . O aumento da TCO para  $15,0$  e  $20,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  resultou em necessidade de incremento da concentração para  $0,20 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$ . O pH nas amostras de efluente do RALF-MT permaneceu entre 7,6 e 8,2 para as TCOs entre  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

O aumento da TCO de  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  levou ao aumento da concentração de AGV nas amostras de efluente do RALF-MT de  $108 \pm 49 \text{ mg HAc L}^{-1}$  para  $1364 \pm 283 \text{ mg HAc L}^{-1}$ . Já a relação AI/AP entre 0,28 e 0,50 indicam operação estável do reator para as TCO entre  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (BALAGUER; VICENT; PARÍS, 1992). O metabólito líquido majoritário no efluente do RALF-MT em TCOs de  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi o HPr ( $> 94\%$  da fração molar). Contudo, foi observado aumento da relação AI/AP para 0,93 ao aumentar a TCO para  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e foram detectados HPr ( $322 \text{ mg L}^{-1}$ ) e HAc ( $162 \text{ mg L}^{-1}$ ) na fase líquida. É importante mencionar que a concentração de HPr em  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a partir do aumento lento e escalonado da concentração de cossustratos ( $699 \text{ mg HPr L}^{-1}$ ) foi similar à concentração observada em  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ao realizar aumento rápido da concentração de cossustratos ( $687 \text{ mg HPr L}^{-1}$ ).

Tabela 16. Valores médios de AGV e relação AI/AP nas amostras de efluente do RALF-MT em função da TCO aplicada

Etapa	Concentração (g DQO L <sup>-1</sup> )	AGV <sub>efluente</sub> (mg HAc L <sup>-1</sup> )	AI/AP <sub>efluente</sub>
1	2	108 ± 49	0,50 ± 0,13
2	5	125 ± 73	0,29 ± 0,09
3	7,5	137 ± 55	0,28 ± 0,08
4	10	1124 ± 155	0,41 ± 0,09
5	15	1002 ± 371	0,40 ± 0,14
6	15	923 ± 78	0,37 ± 0,03
7	20	1364 ± 283	0,93 ± 0,22

AGV<sub>eflu</sub>: ácidos graxos voláteis efluente; AI: alcalinidade intermediária; AP: alcalinidade parcial.

O aumento da concentração de AGV para 1364 mg HAc L<sup>-1</sup> e da relação AI/AP para 0,93 no RALF-MT em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> são condizentes com a redução da eficiência de remoção de matéria orgânica para 78,6% nessa condição operacional. Vlassis et al. (2013) utilizaram CSTR para produção de metano a partir de glicerina (5; 7,5 e 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) e observaram eficiências de remoção de matéria orgânica superiores a 95% em 5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Contudo, ao aumentar a TCO para 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> os autores reportaram acúmulo dos HPr e HAc. O acúmulo dos HAc (53%) e HPr (22%), a redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 70% para 51%, e o aumento da relação AI/AP de 0,38 para 0,87 foram relatados por Siqueira, Damiano e Silva (2013) como consequência do aumento da TCO de 3,33 para 26,19 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na digestão de vinhaça em RALF mesofílico. Ainda assim, a concentração de AGV na co-digestão de vinhaça e glicerol em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (1364 mg HAc L<sup>-1</sup>) foi inferior as observadas em mono-digestão termofílica de vinhaça em RALF (6299 mg HAc L<sup>-1</sup>) (RAMOS et al., 2021) e AnSBBR (1526 mg HAc L<sup>-1</sup>) (DE ALBUQUERQUE et al., 2019).

Apesar da redução da eficiência de remoção de matéria orgânica no RALF-MT em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e da detecção de HAc e HPr em TCO superiores a 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, foi observada alcalinidade à bicarbonato no efluente de 2274 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, superior à

alcalinidade afluente ( $964 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ). O oposto foi verificado por T.B. Costa et al. (2021) e Aquino, Fuess e Pires (2017) em mono-digestão de glicerol e vinhaça, respectivamente. Costa et al. (2021) observaram alcalinidade efluente ( $3.780 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) inferior a afluente ( $4.160 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) ao aumentar a TCO para  $6,8 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Os autores associaram esta ocorrência ao acúmulo de AGV que levou à redução da eficiência de remoção de matéria orgânica no RALF termofílico (T.B. COSTA et al., 2021). Aquino, Fuess e Pires (2017) observaram decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica de 73% para 54% em FVR e de 82% para 58% em PBR ao aumentar a TCO de  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $18 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Os autores apontaram que o acúmulo de AGV e redução da remoção de matéria orgânica levaram ao aumento da relação AI/AP para 0,65 e para 0,66 mesmo em aplicação de  $0,30 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}$ .

A dose de  $\text{NaHCO}_3$  aplicada no RALF-MT ( $0,10 - 0,20 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$ ) foi inferior à adicionada aos FVR e PBR aplicados em mono-digestão de vinhaça ( $0,30 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$ ) (AQUINO; FUESS; PIRES, 2017). A necessidade de adição de  $\text{NaHCO}_3$  no RALF-MT também foi inferior a reportada por Ramos e Silva (2019) ( $0,70 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$ ) e Siqueira, Damiano e Silva (2013) ( $1,0 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$ ) em mono-digestão de vinhaça de cana-de-açúcar em RALF. A menor necessidade de  $\text{NaHCO}_3$  no RALF-MT é benéfica do ponto de vista econômico e pode ser relacionada à capacidade tamponante do glicerol (RIVERO et al., 2014) e à redução do sulfato presente na vinhaça (Figura 20).

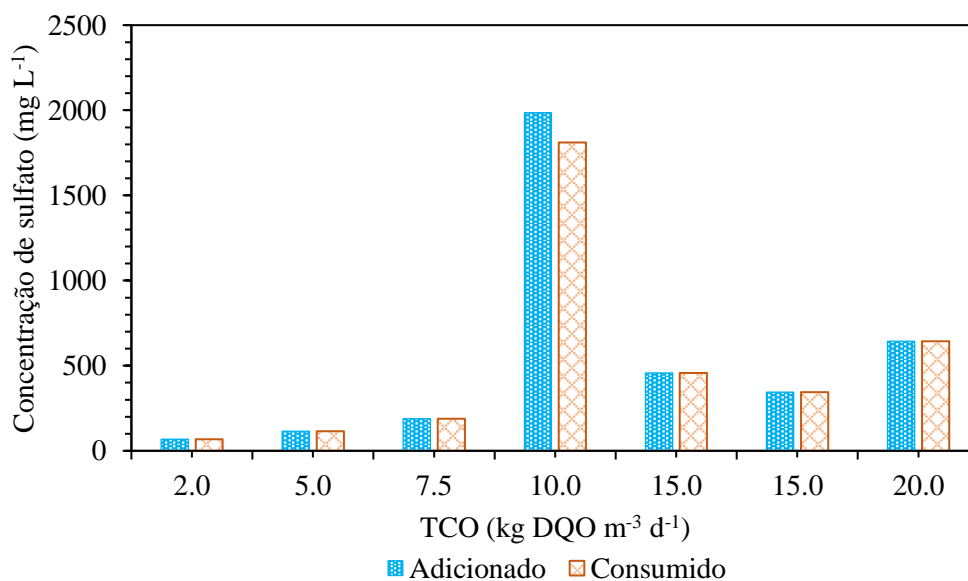


Figura 20. Concentração de sulfato removida em função da TCO aplicada ao RALF-MT

A relação entre a remoção de sulfato e a prevenção da acidificação do reator também pode ser observada no RALF termofílico do estudo de Ramos et al. (2021). Os autores observaram aumento das concentrações de HAc de 1167 para 2627 mg L<sup>-1</sup> e de HPr de valores não detectáveis para 3202 mg L<sup>-1</sup> coincidentes com a redução da remoção de sulfato de 100% para 0% ao incrementar a TCO de 15 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Em contrapartida, no RALF-MT as concentrações de HAc e HPr em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foram de 162 mg L<sup>-1</sup> e 322 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, coincidentes com a remoção total do sulfato adicionado (Figura 20). Isto ocorreu provavelmente porque na degradação de substratos ricos em sulfato o HPr é rapidamente oxidado em HAc (QATIBI; BORIES; GARCIA, 1990), que por sua vez é convertido em metano. Então, enquanto no RALF-MT a conversão de sulfato contribuiu para a redução de acúmulo de ácidos, no RALF do estudo de Ramos et al. (2021) a elevada concentração de sulfato inibiu a atividade de bactérias redutoras de sulfato. Apesar de ser relacionada à redução da produtividade de metano (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017), a redução de sulfato para relação DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> superior a 25, como no caso da maioria das condições aplicadas ao RALF-MT, pode ter colaborado para estabilidade da produção de metano do reator (Tabela 17) (CETECIOGLU et al., 2019).

Tabela 17. Produção de metano no RALF-MT em função da TCO aplicada

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>%CH<sub>4</sub></b>	<b>PVM (L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>leito</sub>)</b>	<b>PVM (L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub>)</b>	<b>MY (mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>remov</sub>)</b>
1	2	81,3 ± 4,9	0,94 ± 0,19	0,29 ± 0,01	170 ± 17
2	5	64,1 ± 2,8	3,62 ± 0,27	1,19 ± 0,01	264 ± 13
3	7,5	69,0 ± 4,6	4,41 ± 0,43	1,96 ± 0,01	265 ± 18
4	10	66,4 ± 5,7	4,82 ± 0,46	2,27 ± 0,02	279 ± 20
5	15	65,9 ± 7,9	7,23 ± 1,26	3,80 ± 0,04	262 ± 22
6	15	69,6 ± 2,4	7,24 ± 0,49	3,49 ± 0,05	269 ± 34
7	20	62,4 ± 6,9	8,83 ± 0,62	5,20 ± 0,04	260 ± 30

%CH<sub>4</sub>: percentual de metano no biogás; PVM<sub>leito</sub>: produção volumétrica de metano por volume de leito fluidificado; PVM<sub>reator</sub>: produção volumétrica de metano por volume total de reator; MY: rendimento de metano.

Na Figura 21 e Figura 22 é possível observar o efeito do aumento da TCO de 2 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na PVM e no MY, respectivamente.

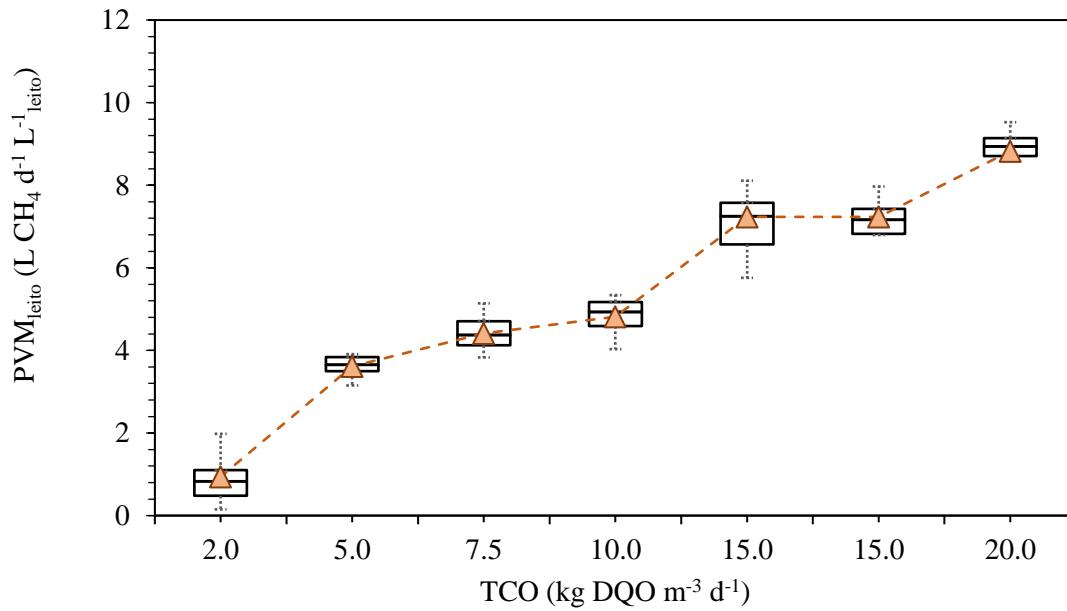


Figura 21. Efeito do aumento da TCO na PVM<sub>Leito</sub> do RALF-MT

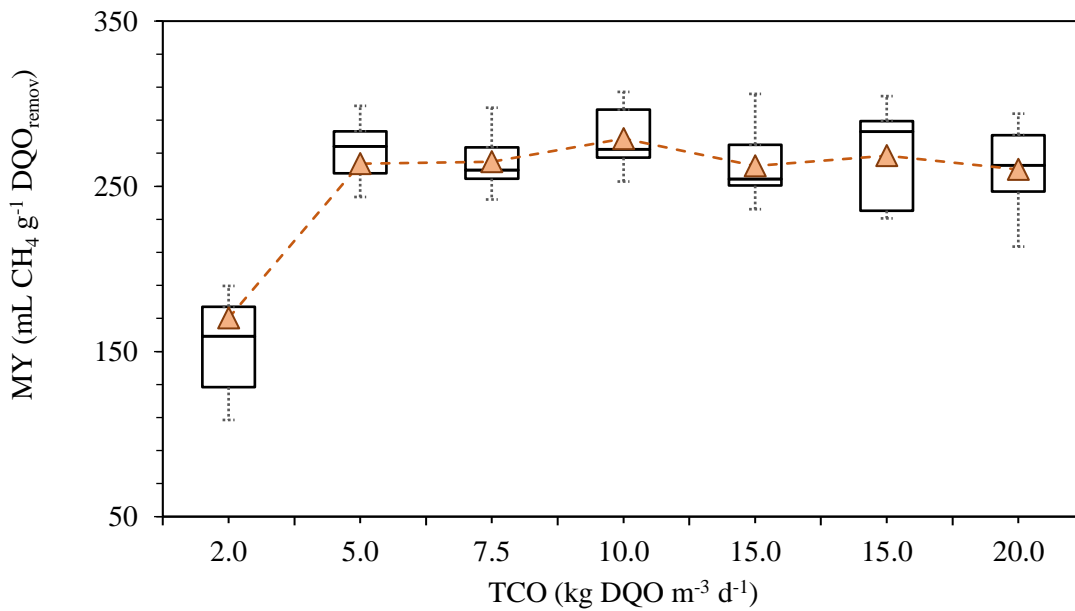


Figura 22. Efeito do aumento da TCO no MY do RALF-MT



O aumento da  $PVM_{\text{reator}}$  como resultado do aumento da TCO de 2 para 20 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  (Figura 21) é um resultado esperado e está associado ao aumento da disponibilidade de carbono no reator. O aumento da PVM como resultado do aumento da TCO foi reportado para produção de metano a partir da digestão de vinhaça (ALMEIDA et al., 2017; AQUINO; FUESS; PIRES, 2017; DE ALBUQUERQUE et al., 2019; RAMOS; SILVA, 2020; RAMOS et al., 2021) e de glicerol (T.B. COSTA et al., 2021). O aumento da TCO de 1,1 para 10,1 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  no estudo de Almeida et al. (2017) realizado em AnSBR (35 °C) levou ao aumento da  $PVM_{\text{reator}}$  de 0,11 para 2,77 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{reator}}$  em mono-digestão de vinhaça. O aumento da  $PVM_{\text{reator}}$  de 0,03 para 0,97 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{reator}}$  com aumento da TCO de 1,2 para 5,5 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  também foi reportado por Albanez et al. (2016a) ao digerir vinhaça em AnSBBR. Siqueira, Damiano e Silva (2013) realizaram a mono-digestão da vinhaça em RALF mesofílico (30 °C) e observaram aumento da  $PVM_{\text{leito}}$  de 0,9 para 5,37 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$  com o aumento da TCO de 3,3 para 26,2 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ . Contudo, é possível observar que para a menor TCO aplicada no estudo de Siqueira, Damiano e Silva (2013) (3,3 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ ), a  $PVM_{\text{leito}}$  de 0,87 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$  foi inferior à  $PVM_{\text{leito}}$  do RALF-MT (0,94 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ ) com adição de glicerina e operado sob condição termofílica. Além disso,  $PVM_{\text{leito}}$  da co-digestão termofílica de vinhaça e glicerina em 20 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  (8,83 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ ) foi superior a observada por Siqueira, Damiano e Silva (2013) em 26,2 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  (5,37 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ ).

O RALF-MT apresentou os maiores valores de PVM na maior TCO aplicada. Porém, na digestão de vinhaça em RALF termofílico foi observada redução da  $PVM_{\text{leito}}$  de 3,78 para 1,56 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$  ao aumentar a TCO de 7,5 para 10 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  (RAMOS; SILVA, 2020). O aumento da TCO de 2 para 10 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  na digestão termofílica de vinhaça em RALF no estudo de Ramos et al. (2021) levou ao aumento da  $PVM_{\text{reator}}$  de 0,4 para 1,6 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ . Já o posterior aumento da TCO para 15 e 20 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  acarretou redução da  $PVM_{\text{reator}}$  1,5 e 1,0 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ , respectivamente (RAMOS et al., 2021). A digestão de glicerol não foi realizada em RALF para TCOs superiores a 7,6 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  (T.B. COSTA et al., 2021). Em contrapartida, a co-digestão termofílica de vinhaça e glicerol em 7,5 kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  (4,41 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ ) levou a valores de  $PVM_{\text{leito}}$  superiores a mono-digestão de glicerol em RALF termofílico (2,04 L  $CH_4 d^{-1} L^{-1}_{\text{leito}}$ ). Os resultados de  $PVM_{\text{leito}}$  do RALF-MT foram superiores aos da mono-digestão termofílica de vinhaça (RAMOS; SILVA, 2020; RAMOS et al., 2021) e glicerol (T.B. COSTA et al., 2021) em RALF termofílico e podem ser relacionados à falha da mono-digestão devido ao acúmulo de AGV (VLISSIDIS; ZOUBOULIS, 1993).

Os efeitos deletérios do aumento da concentração de AGV foram previamente associados à digestão de glicerol, uma vez que, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi reduzida para 67,7% em 6,8 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (T.B. COSTA et al., 2021). Contudo, o MY permaneceu estável entre 275 e 331 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em mono-digestão de glicerol apesar da redução da eficiência de remoção de matéria orgânica (T.B. COSTA et al., 2021). Os valores de MY do RALF-MT (entre 260 e 279 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) foram inferiores aos observados em mono-digestão termofílica de glicerol (entre 275 e 331 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) (T.B. COSTA et al., 2021). Além disso, os valores também foram inferiores aos observados em mono-digestão de glicerol em ABR (330 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) (VLASSIS et al., 2013) e CSTR (345 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) (HUTŇAN; KOLESÁROVÁ; BODÍK, 2013). Porém, a produção de metano no RALF-MT permaneceu estável para TCOs entre 5 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 18).

Os maiores valores de MY na mono-digestão de glicerol em relação a co-digestão de glicerol e vinhaça podem ser associados ao fato de que no caso do glicerol a matéria orgânica removida é utilizada para produção de metano e crescimento celular. Isto explica por que o MY em estado estacionário na menor TCO aplicada (184 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) em mono-digestão termofílica de glicerol foi inferior aos observados nas demais TCOs (275 - 331 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) (T.B. COSTA et al., 2021). Neste caso, a matéria orgânica afluyente foi insuficiente para garantir ambas reposição da biomassa lavada do RALF (YESHANEW et al., 2016) e elevada produção de metano em 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (T.B. COSTA et al., 2021). T.B. Costa et al. (2021) também apontaram que a reposição da biomassa nas demais TCOs aplicadas foram responsáveis pela diferença entre os valores de MY observados e o MY teórico em CNTP (350 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>). O padrão observado no RALF-MT foi similar ao observado por T.B. Costa et al. (2021), ou seja, o MY foi de 170 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> em 2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Entretanto, a remoção de matéria orgânica para redução de sulfato presente na vinhaça pode justificar o menor valor de MY do RALF-MT em relação à mono-digestão de glicerol (T.B. COSTA et al., 2021).

Kiyuna et al. (2017) indicaram redução da produtividade de metano em 35% na aplicação de DQO: sulfato de 7,5 em relação a 12. Isto ocorre devido à oxidação do acetato a sulfeto e carbonato por bactérias redutoras de sulfato (Equação 5.1), e então configura competição por substrato com arqueias acetoclásticas (Equação 5.2) (OZTEMUR et al., 2020). Além disso, a redução de sulfato pode ser realizada a partir do consumo de hidrogênio (Equação 5.3) (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017), que pode diminuir a produção de metano por arqueias hidrogenotróficas (Equação 5.4). Ao considerar o consumo teórico de 0,67 g DQO g<sup>-1</sup> SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> na

redução de sulfato a sulfeto (OZTEMUR et al., 2020), a redução de sulfato no RALF-MT pode ter sido responsável pela diminuição da produtividade de metano em 25 mL CH<sub>4</sub> por dia em 2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> até 233 mL CH<sub>4</sub> por dia em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.



No RALF-MT os efeitos negativos da redução de sulfato foram provavelmente atenuados pela adição de glicerol, uma vez que, essa adição fez com que a relação DQO: sulfato da vinhaça fosse acrescida para entre 29 e 43. A atividade das bactérias redutoras de sulfato no RALF-MT ainda podem ter colaborado para tamponamento do reator, deslocamento do equilíbrio no sentido de produção de AGV (SILVA et al., 2020a) e na oxidação de HPr (QATIBI; BORIES; GARCIA, 1990). A relação DQO: sulfato entre 2 e 23 na digestão de vinhaça como mono-substrato pode ter colaborado para estabilidade da eficiência de remoção de matéria orgânica até 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Porém, em mono-digestão a atividade das bactérias redutoras de sulfato também pode ter sido a causa da redução do MY de 280 para 200, 130 e 110 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> ao aumentar a TCO de 5 para 10; 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (RAMOS et al., 2021). Então, a eficiência de remoção de matéria orgânica do RALF-MT foi melhorada em relação a mono-digestão termofílica de vinhaça em RALF. Ainda, os valores de MY do RALF-MT foram superiores aos observados em mono-digestão termofílica de vinhaça (110 - 280 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>). Portanto, a co-digestão de vinhaça e glicerol permitiu aplicação de TCOs entre 5 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> com elevada eficiência de remoção de matéria orgânica (78,6% - 92,4%) e estabilidade do MY em todas as TCO aplicadas.

### 5.1.2 Composição microbiana no RALF-MT em 10,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C

A distribuição taxonômica da comunidade microbiana extraída do pneu triturado do RALF-MT em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> indica que o domínio mais abundante foi o Bacteria (80,74%), seguido do domínio Archaea (19,24%). A maior abundância relativa de

microrganismos do domínio Bactéria é porque estes são responsáveis pelos estágios de hidrólise, acidogênese e acetogênese na digestão anaeróbia. Então, o acúmulo de AGV tende a ser resultado da maior abundância relativa de bactérias em relação a arqueias. Ali et al. (2020) observaram remoção de AGV igual a 47% e associaram à abundância relativa de bactérias e arqueias igual a 97,64% e 1,78%, respectivamente. Toledo-Cervantes et al. (2018) observaram que a relação entre arqueias e procariontes (relação A/P) decresceu de 32% para 1% como resultado do aumento da TCO de 2,7 para 12 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Este aumento da TCO no estudo dos autores também foi acompanhado do decréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica de 95,2% para 74,1%. Então, a relação A/P igual a 19,2% é coerente com a eficiência de remoção de matéria orgânica no RALF-MT e indica que houve equilíbrio na troca de substratos energéticos entre bactéria e arqueias neste reator (TOLEDO-CERVANTES et al., 2018).

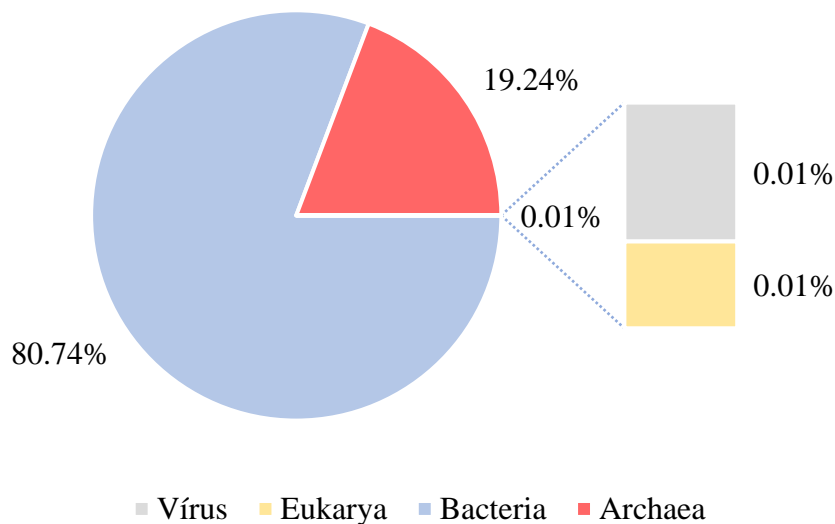


Figura 23. Perfil taxonômico em nível de domínio da biomassa extraída do meio suporte do RALF-MT em 10,0 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C. As sequências de DNA foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya

Em relação aos microrganismos do domínio Archaea, 99% dos representantes foram identificados como pertencentes ao filo Euryarchaeota (Figura 24) (ordem: Methanobacteriales e Methanosarcinales). O gênero mais abundante na biomassa extraída do RALF-MT foi *Methanotherix*, ou *Methanosaeta*, representando 86% das Euryarchaeota (Figura 25). Os microrganismos pertencentes ao gênero *Methanotherix* junto com *Methanosarcina* são arqueias acetoclásticas e, portanto, responsáveis por dois terços da produção de metano na digestão

anaeróbia (ORDAZ-DIAZ; BAILON-SALAS, 2020). *Methanosarcina* são associados à maior robustez do reator anaeróbio pois tem maior velocidade máxima de crescimento específico ( $0,6 \text{ d}^{-1}$ ), maior tolerância ao íon amônio ( $<7,000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e maior tolerância a elevadas concentrações de acetato ( $<15,000 \text{ mg L}^{-1}$ ) do que *Methanotrrix* ( $0,2 \text{ d}^{-1}$ ,  $<3,000 \text{ mg L}^{-1}$  e  $<3,000 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente) (DE VRIEZE et al., 2012). Então, em condições operacionais que favorecem a rápida acidificação do substrato os microrganismos do gênero *Methanosarcina* se destacam (CONKLIN; STENSEL; FERGUSON, 2006). Esta característica pode ser a explicação para elevada abundância de *Methanosarcina* na digestão de glicerol (VASCONCELOS et al., 2019).

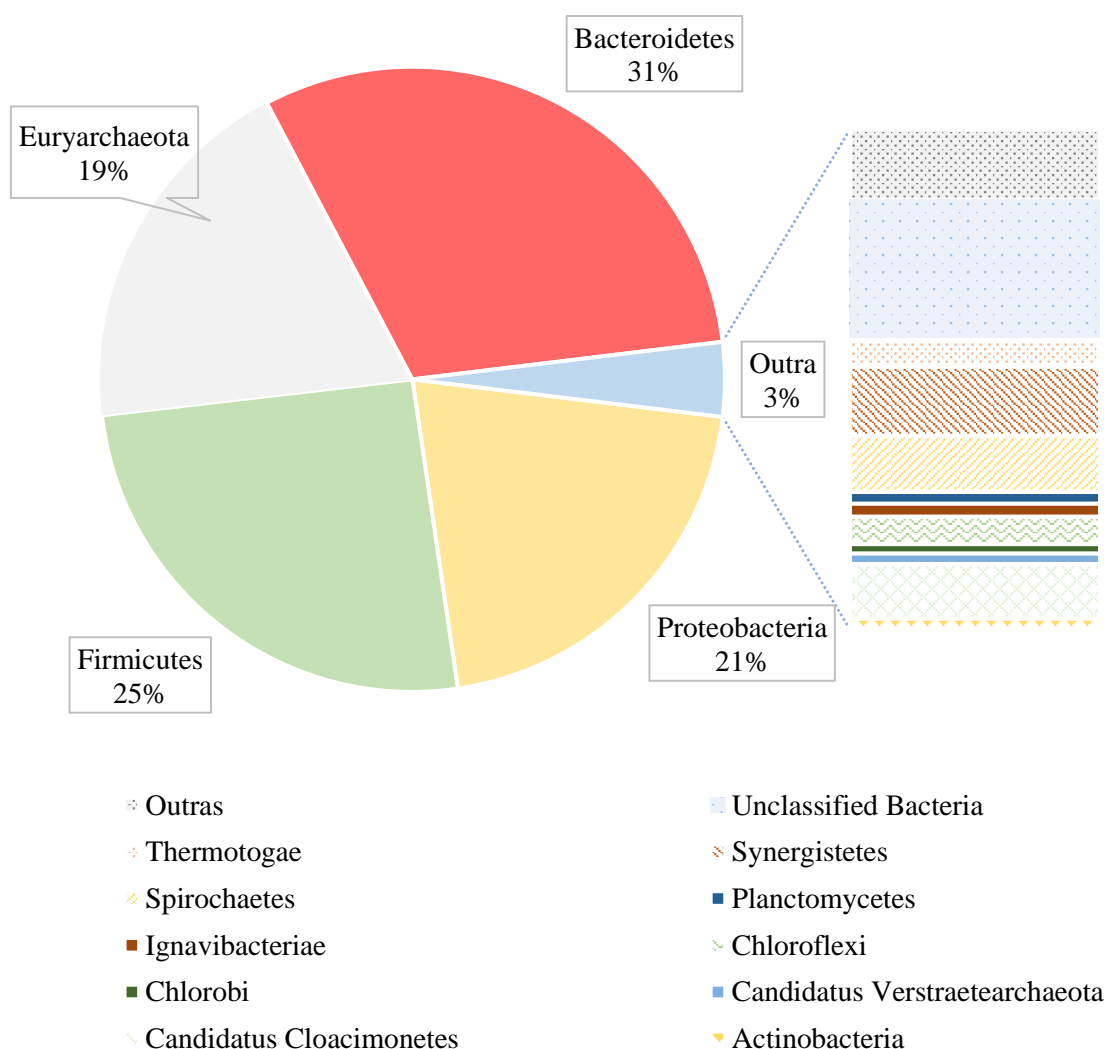


Figura 24. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-MT em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $55 \text{ }^\circ\text{C}$

Camargo et al. (2022) caracterizaram o mesmo inóculo utilizado no presente estudo (lodo granulado de reator UASB termofílico em escala real aplicado ao tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar) por meio da análise metagenômica e relataram que os gêneros de arqueia mais dominantes foram *Methanosarcina* (0,61 %), *Methanothermobacter* (0,38 %) e *Methanoculleus* (0,30 %). Então é possível inferir que o glicerol utilizado como cossustrato ou mesmo a configuração do reator utilizada no presente estudo não foram favoráveis a essas arqueias, uma vez que a arqueia mais abundante no RALF-MT foi *Methanotrrix*.

*Methanosarcina* foram identificados em menor abundância relativa (0,09%) no RALF-MT apesar da adição de glicerol. Isto pode ser confirmado pelo fato de em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> não ter sido determinado HAc nas amostras de efluente do RALF-MT. Além disso, a predominância de *Methanotrrix* é atribuída a relação AI/AP < 0,3 (RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986), como foi de fato observada no RALF-MT nesta condição operacional. A maior abundância relativa de *Methanotrrix* já foi previamente relatada na digestão termofílica de vinhaça (VAN HAANDEL et al., 2014). Portanto, a adição de glicerol no RALF-MT pode não ter levado a acidificação excessiva do reator ou pode ter ocasionado em maior produção de HPr na acidogênese, visto que, HPr inibe a atividade de *Methanosarcina* (ILTCHENCO et al., 2020). Porém, o HPr está associado a produção de hidrogênio por arqueias hidrogenotróficas (DETMAN et al., 2021). Então, como *Methanobacterium*, que é um gênero de arqueias hidrogenotróficas, foi identificado em baixa abundância relativa (2,6%) no RALF-MT, conclui-se o glicerol não acarretou acidificação excessiva do reator quando em co-digestão. De fato, Razaviarani e Buchanan (2015) observaram que a adição de glicerol a lodo de esgoto municipal levou a redução da abundância relativa de *Methanomicrobiales* e aumento da abundância relativa de *Methanosarcinales*.

Em relação ao domínio Bactéria, os microrganismos pertencentes aos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria foram os mais abundantes (Figura 24). Estes filos estão dentre os mais abundantes em reatores de digestão anaeróbia independentemente do substrato utilizado (CALLEJAS et al., 2021). Contudo, elevadas temperaturas, como 55 °C, são associadas a redução da abundância relativa de Bacteroidetes e Proteobacteria e aumento da abundância relativa de Firmicutes (HUPFAUF et al., 2018; LIU et al., 2018). Isto porque Firmicutes são capazes de degradar uma ampla variedade de substratos em condições adversas de temperatura e salinidade (CALLEJAS et al., 2021). Em contrapartida, Bacteroidetes são atribuídas a maior eficiência na degradação de fenóis, aminoácidos e aminas do que Firmicutes (SCHIEVANO et al., 2012). Então, no caso da vinhaça de cana-de-açúcar, i. e., substrato rico em compostos recalcitrantes, a identificação de Bacteroidetes em abundância relativa superior

a Firmicutes é justificada apesar da temperatura de operação. Itchenco et al. (2020) observaram aumento da abundância relativa de Bacteroidetes de 18,7% no lodo de inóculo para 58,5% ao final da operação de reator alimentado com vinhaça. Callejas et al. (2021) ainda indicaram que o aumento da abundância relativa de Firmicutes coincide com aumento excessivo da acidificação e consequente redução da produtividade de metano na digestão de vinhaça. Essa acidificação excessiva não foi identificada no RALF-MT em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Apesar da inoculação do RALF-MT com lodo retirado de reator termofílico e da manutenção da temperatura de operação em 55 °C por 355 dias até a coleta da biomassa para análise metagenômica, os microrganismos apresentaram características mesofílicas. *Petrimonas*, *Macellibacteroides* e *Parabacteroides* compuseram 17%, 12% e 9% dos Bacteroidetes, respectivamente. *Petrimonas* é um gênero de bactérias fermentativas e acetogênicas comumente encontrado em digestores mesofílicos (AO et al., 2021). *Macellibacteroides* também apresentam crescimento em condições de temperatura entre 20 °C e 45 °C (JABARI et al., 2012). Pap et al. (2015) identificaram *Parabacteroides* em condição termofílica e ainda apontaram que o digestor operado em condição termofílica apresentou características mesofílicas. Porém, a operação em longo prazo (> 80 dias) em condição termofílica ocasionou aumento na abundância relativa de Firmicutes e redução na abundância relativa de Bacteroidetes no estudo dos autores (PAP et al., 2015), como já esperado na digestão de substratos diversos (HUPFAUF et al., 2018; LIU et al., 2018). No RALF-MT, a permanência de *Petrimonas* e *Macellibacteroides* pode ter sido relacionada ao fato de que alguns representantes destes gêneros utilizam sulfato, abundante em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, como aceptor final de elétrons (JABARI et al., 2012).

A elevada concentração de sulfato em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (1811 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>) também pode ter sido responsável pela elevada abundância relativa de Proteobacteria no RALF-MT. Diversas Proteobactérias são reconhecidas como BRS, ou seja, o sulfato é utilizado como aceptor terminal de elétrons e como agente oxidante para a degradação de compostos orgânicos, levando à produção de sulfetos (SANTOS et al., 2022). Devido à sua termodinâmica, taxa de crescimento e afinidade do substrato, o BRS supera os metanogênicos, além de sua intoxicação derivada do sulfeto de hidrogênio, podendo afetar negativamente a produção de metano (RAMOS et al., 2021). Contudo, sabe-se que outros compostos orgânicos (como lactato, glicerol, etanol) podem atuar como doadores de elétrons para o BRS (SANTOS et al., 2022), sendo possível inferir que a competição com os metanogênicos pelo acetato é mais pronunciada na ausência de fontes alternativas de carbono.

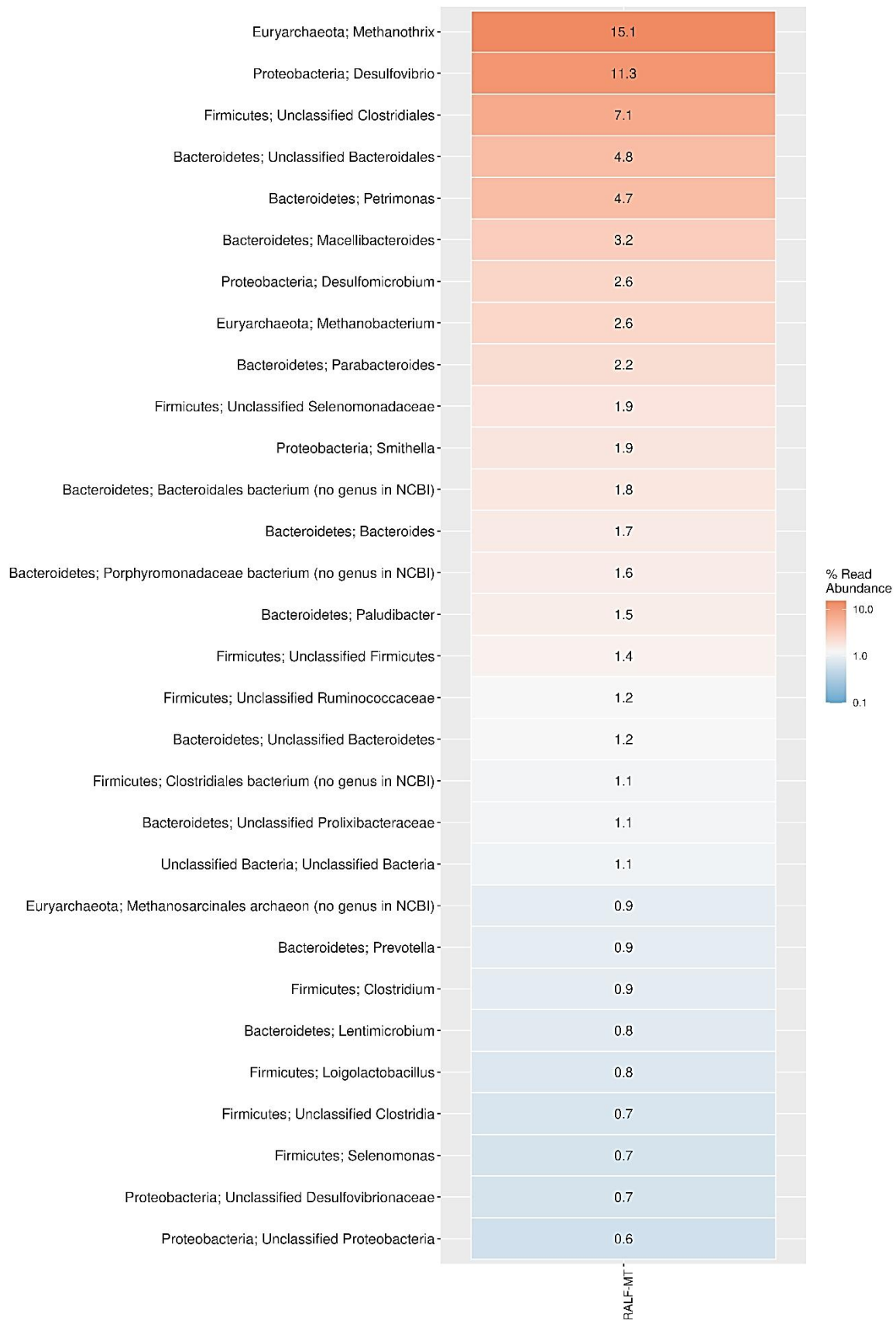


Figura 25. Mapa de calor contendo valores relativos dos Filos; Gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-MT em  $10,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $55 \text{ }^\circ\text{C}$



No RALF-MT, é possível inferir que a adição de glicerol contribuiu para a estabilidade do sistema, uma vez que o BRS também pode utilizar este composto como substrato (SANTOS et al., 2022), reduzindo a competição com microrganismos metanogênicos. Além disso, a competição de BRS com as bactérias pode ter prevenido a acidificação do reator, reduzindo a necessidade de alcalinizantes. *Desulfovibrio* foi o gênero de bactérias mais abundante em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 24) e compuseram 44% de Proteobacteria. *Desulfomicrobium* também foram identificados em abundância relativa igual a 2,6%, ou seja, 6% de Proteobacteria. *Desulfovibrio* são microrganismos hidrogenotróficos e oxidantes incompletos (R.B. COSTA et al., 2021), o que pode ter contribuído para geração de acetato no RALF-MT e estar em acordo com a baixa abundância relativa de *Methanobacterium* e alta abundância relativa de *Methanothrix* neste reator. Além disso, espécies deste gênero podem utilizar HLa e glicerol como doadores de elétrons (R.B. COSTA et al., 2021), ambos compostos presentes na alimentação do RALF-MT. Microrganismos do gênero *Smithella* também foram identificados na amostra do reator. Por sua vez, estas bactérias sintróficas são associadas a oxidação do HPr em condição mesofílica (DETMAN et al., 2021), principalmente quando em associação com microrganismos hidrogenotróficos (JIANG et al., 2018). A identificação de *Smithella*, mesmo que em menor abundância relativa do que outros representantes de Proteobacteria, podem ter contribuído para estabelecimento de *Methanothrix* no RALF-MT.

### 5.1.3 Distribuição das funções metabólicas no RALF-MT

Na Tabela 18 estão apresentadas as identificações dos genes associados às etapas de degradação da vinhaça e glicerol no RALF-MT. Os principais subníveis de Nível 1 do KEGG *database* (Metabolismo) no RALF-MT foram metabolismo de carboidratos, metabolismo de lipídios e metabolismo de energia (vias de fixação de carbono em procariotos, metabolismo do enxofre e metabolismo do metano). Com relação à degradação do glicerol, que entra na célula por transporte passivo (MEIER et al., 2020b), os KO predominantes foram os associados a dismutação de glicerol pela via oxidativa (Figura 26). Ao contrário do que ocorre na fermentação de glicerol em caso de inibição da metanogênese (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021), o processo com sinergismo ajustado em digestão não ocasiona em NADH excedente para formação de 1,3-PDO pela via reductiva. Isto pode ser o motivo para baixo percentual de KO associados a enzima de conversão de glicerol a 3-hidroxi-propionaldeído (K06120, EC:4.2.1.30) no RALF-MT.

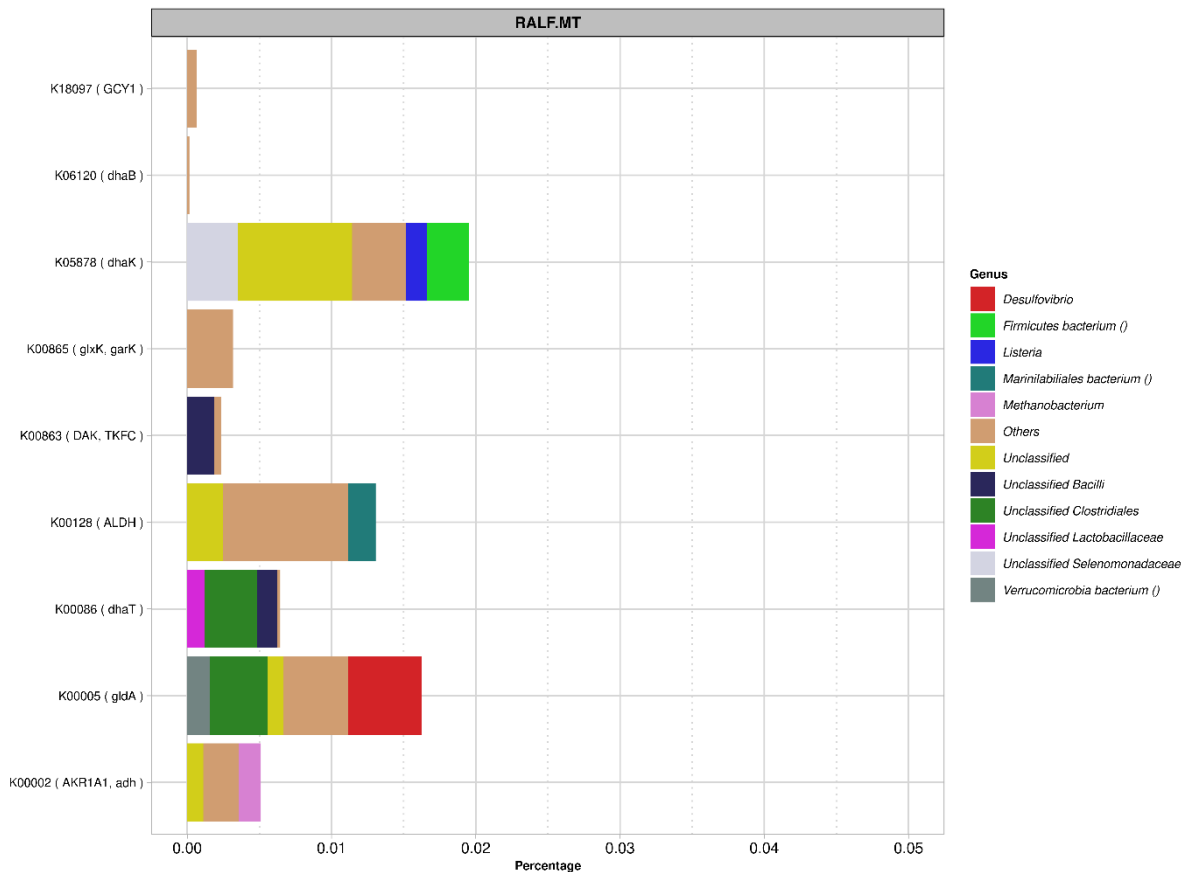


Figura 26. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de glicerol no RALF-MT

Outra síntese comum a partir de vinhaça e glicerol em casos de inibição da metanogênese é a de H<sub>2</sub>U (MEIER et al., 2020b; RAMOS et al., 2021). De fato, genes relacionados às enzimas do metabolismo de butanoato foram identificadas na amostra do RALF-MT (Figura 27) o que indica potencial metabólico do sistema para formação de H<sub>2</sub>U. Porém, a ausência de H<sub>2</sub>U no efluente pode indicar baixa atividade enzimática neste metabolismo. Além disso, os KO com maior percentual no RALF-MT foram os associados aos genes acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit (K01034, EC:2.8.3.8 2.8.3.9), butyrate kinase (K00929, EC:2.7.2.7), acetyl-CoA C-acetyltransferase (K00626, EC:2.3.1.9), butyryl-CoA dehydrogenase (K00248), 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (K00074, EC:1.1.1.157). A abundância destes genes pode estar relacionada à degradação e não à síntese de H<sub>2</sub>U e H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>U no RALF-MT, uma vez que, devido à composição da vinhaça utilizada em 10 g DQO L<sup>-1</sup> (Tabela 9) as concentrações afluentes de H<sub>2</sub>U e H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>U foram de 24 mg L<sup>-1</sup> e 51 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tabela 18. Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Glicólise	GAPDH, gapA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	EC:1.2.1.12	K00134
	HK	hexokinase	EC:2.7.1.1	K00844
	glk	glucokinase	EC:2.7.1.2	K00845
	pfkA, PFK	6-phosphofructokinase 1	EC:2.7.1.11	K00850
	PK, pyk	pyruvate kinase	EC:2.7.1.40	K00873
	PGK, pgk	phosphoglycerate kinase	EC:2.7.2.3	K00927
	INV, sacA	beta-fructofuranosidase	EC:3.2.1.26	K01193
	PGAM, gpmA	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	K01834
	pgi1	glucose-6-phosphate isomerase, archaeal	EC:5.3.1.9	K06859
	adhP	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	EC:1.1.1.1	K13953
	yiaY	alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.1	K13954
	gpmI	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15633
	apgM	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15635
Piruvato	E1.1.1.1, adh	alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.1	K00001
	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.2	K00002
	LDHD, dld	D-lactate dehydrogenase (cytochrome)	EC:1.1.2.4	K00102
	exaA	alcohol dehydrogenase (cytochrome c)	EC:1.1.2.8	K00114

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	frmA, ADH5, adhC	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.284 1.1.1.1	K00121
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	porB	pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit	EC:1.2.7.1	K00170
	frdA	fumarate reductase flavoprotein subunit	EC:1.3.5.4	K00244
	DLD, lpd, pdhD	dihydrolipoamide dehydrogenase	EC:1.8.1.4	K00382
	DLAT, aceF, pdhC	pyruvate dehydrogenase E2 component	EC:2.3.1.12	K00627
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
Piruvato	ppdK	pyruvate, orthophosphate dikinase	EC:2.7.9.1	K01006
	pps, ppsA	pyruvate, water dikinase	EC:2.7.9.2	K01007
	oadA	oxaloacetate decarboxylase (Na <sup>+</sup> extruding) subunit alpha	EC:7.2.4.2	K01571
	E4.1.1.32, pckA, PCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	EC:4.1.1.32	K01596
	E4.1.1.49, pckA	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	EC:4.1.1.49	K01610
	aceB, glcB	malate synthase	EC:2.3.3.9	K01638
	E4.2.1.2A, fumA, fumB	fumarate hydratase, class I	EC:4.2.1.2	K01676
		acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Piruvato	PC, pyc	pyruvate carboxylase	EC:6.4.1.1	K01958
	por, nifJ	pyruvate-ferredoxin/ferredoxin oxidoreductase	EC:1.2.7.1	K03737
	ldhA	D-lactate dehydrogenase	EC:1.1.1.28	K03778
	eutG	alcohol dehydrogenase		K04022
	mhpF	acetaldehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.10	K04073
	aarC, cat1	succinyl-CoA:acetate CoA-transferase	EC:2.8.3.18	K18118
	bphJ, xylQ, nahO, tesF	acetaldehyde/propanal dehydrogenase	EC:1.2.1.10 1.2.1.87	K18366
	dld	D-lactate dehydrogenase		K18930
	mleA, mleS	malolactic enzyme	EC:4.1.1.101	K22212
Glicerol	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP+)	EC:1.1.1.2	K00002
	gldA	glycerol dehydrogenase	EC:1.1.1.6	K00005
	dhaT	1,3-propanediol dehydrogenase	EC:1.1.1.202	K00086
	ALDH	aldehyde dehydrogenase (NAD+)	EC:1.2.1.3	K00128
	DAK, TKFC	triose/dihydroxyacetone kinase / FAD-AMP lyase (cyclizing)	EC:2.7.1.28 2.7.1.29 4.6 .1.15	K00863
	glxK, garK	glycerate 2-kinase	EC:2.7.1.165	K00865
	dhaK	phosphoenolpyruvate---glycerone phosphotransferase subunit DhaK	EC:2.7.1.121	K05878
	dhaB	glycerol dehydratase large subunit	EC:4.2.1.30	K06120
GCY1	glycerol 2-dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.156	K18097	

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Propionato	mmsA, iolA, ALDH6A1	malonate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating) / methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.18 1.2.1.27	K00140
	BCKDHA, bkdA1	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component alpha subunit	EC:1.2.4.4	K00166
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	E2.3.1.54, pflD	formate C-acetyltransferase	EC:2.3.1.54	K00656
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	pct	propionate CoA-transferase	EC:2.8.3.1	K01026
	MUT	methylmalonyl-CoA mutase	EC:5.4.99.2	K01847
	E5.4.99.2B, mcmA2	methylmalonyl-CoA mutase, C-terminal domain	EC:5.4.99.2	K01849
	ACSS1_2, acs	acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
	acdA	acetate---CoA ligase (ADP-forming) subunit alpha	EC:6.2.1.13	K01905
	ACSS3, prpE	propionyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.17	K01908
	PCCA, pccA	propionyl-CoA carboxylase alpha chain	EC:6.4.1.3	K01965
	PCCB, pccB	propionyl-CoA carboxylase beta chain	EC:6.4.1.3 2.1.3.15	K01966
	MCEE, epi	methylmalonyl-CoA/ethylmalonyl-CoA epimerase	EC:5.1.99.1	K05606
	DBT, bkdB	2-oxoisovalerate dehydrogenase E2 component	EC:2.3.1.168	K09699

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Propionato	bccA, pccA	acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	EC:6.4.1.2 6.4.1.3 6.3.4.14	K11263
	pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K13788
	pduL	phosphate propanoyltransferase	EC:2.3.1.222	K13923
	pccB	acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit	EC:6.4.1.2 6.4.1.3 2.1.3.15	K19312
	acuI	acrylyl-CoA reductase (NADPH)	EC:1.3.1.-	K19745
HBu	paaH, hbd, fadB, mmgB	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.1.1.157	K00074
	fabV, ter	enoyl-[acyl-carrier protein] reductase / trans-2-enoyl-CoA reductase (NAD <sup>+</sup> )	EC:1.3.1.9 1.3.1.44	K00209
	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	ACAT, atoB	acetyl-CoA C-acetyltransferase	EC:2.3.1.9	K00626
	ptb	phosphate butyryltransferase	EC:2.3.1.19	K00634
	buk	butyrate kinase	EC:2.7.2.7	K00929
	atoD	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit	EC:2.8.3.8 2.8.3.9	K01034
	paaF, echA	enoyl-CoA hydratase	EC:4.2.1.17	K01692
	fadJ	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase	EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3	K01782
	AACS, acsA	acetoacetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.16	K01907
	phbC, phaC	polyhydroxyalkanoate synthase subunit PhaC	EC:2.3.1.-	K03821

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
HBu	phaZ	poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	EC:3.1.1.75	K05973
	E3.1.1.22	hydroxybutyrate-dimer hydrolase	EC:3.1.1.22	K07518
	ccrA	crotonyl-CoA reductase	EC:1.3.1.86	K17829
	croR	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	EC:4.2.1.55	K17865
	ydiF	acetate CoA-transferase	EC:2.8.3.8	K19709
Sulfato	cysJ	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component	EC:1.8.1.2	K00380
	cysI	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component	EC:1.8.1.2	K00381
	cysH	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	EC:1.8.4.8 1.8.4.10	K00390
	sir	sulfite reductase (ferredoxin)	EC:1.8.7.1	K00392
	aprA	adenylylsulfate reductase, subunit A	EC:1.8.99.2	K00394
	aprB	adenylylsulfate reductase, subunit B	EC:1.8.99.2	K00395
	cysC	adenylylsulfate kinase	EC:2.7.1.25	K00860
	cysNC	bifunctional enzyme CysN/CysC	EC:2.7.7.4 2.7.1.25	K00955
	cysN	sulfate adenylyltransferase subunit 1	EC:2.7.7.4	K00956
	cysD	sulfate adenylyltransferase subunit 2	EC:2.7.7.4	K00957
	sat, met3	sulfate adenylyltransferase	EC:2.7.7.4	K00958
	dsrA	dissimilatory sulfite reductase alpha subunit	EC:1.8.99.5	K11180
	dBRS	dissimilatory sulfite reductase beta subunit	EC:1.8.99.5	K11181
	Metano	fdhB	formate dehydrogenase (coenzyme F420) beta subunit	EC:1.17.98.3 1.8.98.6
cdhA		anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase, CODH/ACS complex subunit alpha	EC:1.2.7.4	K00192



Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	cdhC	acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit beta	EC:2.3.1.169	K00193
	cdhD, acsD	acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit delta	EC:2.1.1.245	K00194
	cdhB	anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase, CODH/ACS complex subunit epsilon		K00195
	cdhE, acsC	acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit gamma	EC:2.1.1.245	K00197
	fwdA, fmdA	formylmethanofuran dehydrogenase subunit A	EC:1.2.7.12	K00200
	fwdB, fmdB	formylmethanofuran dehydrogenase subunit B	EC:1.2.7.12	K00201
Metano	fwdC, fmdC	formylmethanofuran dehydrogenase subunit C	EC:1.2.7.12	K00202
	fwdD, fmdD	formylmethanofuran dehydrogenase subunit D	EC:1.2.7.12	K00203
	fwdH	4Fe-4S ferredoxin		K00204
	fwdF, fmdF	4Fe-4S ferredoxin		K00205
	mtd	methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase	EC:1.5.98.1	K00319
	mer	5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase	EC:1.5.98.2	K00320
	mcrA	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	EC:2.8.4.1	K00399
	mcrB	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	EC:2.8.4.1	K00401
	mcrG	methyl-coenzyme M reductase gamma subunit	EC:2.8.4.1	K00402
	mtrA	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit A	EC:2.1.1.86	K00577
	mtrB	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit B	EC:2.1.1.86	K00578

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	mtrC	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit C	EC:2.1.1.86	K00579
	mtrD	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit D	EC:2.1.1.86	K00580
	mtrE	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit E	EC:2.1.1.86	K00581
	mtrF	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit F	EC:2.1.1.86	K00582
	mtrG	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit G	EC:2.1.1.86	K00583
	mtrH	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit H	EC:2.1.1.86	K00584
	E2.3.1.8, pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625
	ftf	formylmethanofuran--tetrahydromethanopterin N-formyltransferase	EC:2.3.1.101	K00672
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	mch	methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase	EC:3.5.4.27	K01499
Metano	ACSS1_2, acs	acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
	hdrA2	heterodisulfide reductase subunit A2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8. 98.5 1.8.98.6	K03388
	hdrB2	heterodisulfide reductase subunit B2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8. 98.5 1.8.98.6	K03389
	hdrB2	heterodisulfide reductase subunit B2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8. 98.5 1.8.98.6	K03389
	hdrC2	heterodisulfide reductase subunit C2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8. 98.5 1.8.98.6	K03390
	hdrD	heterodisulfide reductase subunit D	EC:1.8.98.1	K08264

Tabela 18. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-MT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Metano	hdrE	heterodisulfide reductase subunit E	EC:1.8.98.1	K08265
	fwdG	4Fe-4S ferredoxin		K11260
	fwdE, fmdE	formylmethanofuran dehydrogenase subunit E	EC:1.2.7.12	K11261
	hmd	5,10-methenyltetrahydromethanopterin hydrogenase	EC:1.12.98.2	K13942
	mtbA	[methyl-Co(III) methylamine-specific corrinoid protein]:coenzyme M methyltransferase	EC:2.1.1.247	K14082
	mttB	trimethylamine---corrinoid protein Co-methyltransferase	EC:2.1.1.250	K14083
	mttC	trimethylamine corrinoid protein		K14084
	mvhA, vhuA, vhcA	F420-non-reducing hydrogenase large subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5	K14126
	mvhD, vhuD, vhcD	F420-non-reducing hydrogenase iron-sulfur subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5 1. 8.98.6	K14127
	mvhG, vhuG, vhcG	F420-non-reducing hydrogenase small subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5	K14128
	mvhG, vhuG, vhcG	F420-non-reducing hydrogenase small subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5	K14128
	mtmB	methylamine---corrinoid protein Co-methyltransferase	EC:2.1.1.248	K16176
	hdrA1	heterodisulfide reductase subunit A1	EC:1.8.7.3	K22480
	hdrB1	heterodisulfide reductase subunit B1	EC:1.8.7.3	K22481
	hdrC1	heterodisulfide reductase subunit C1	EC:1.8.7.3	K22482

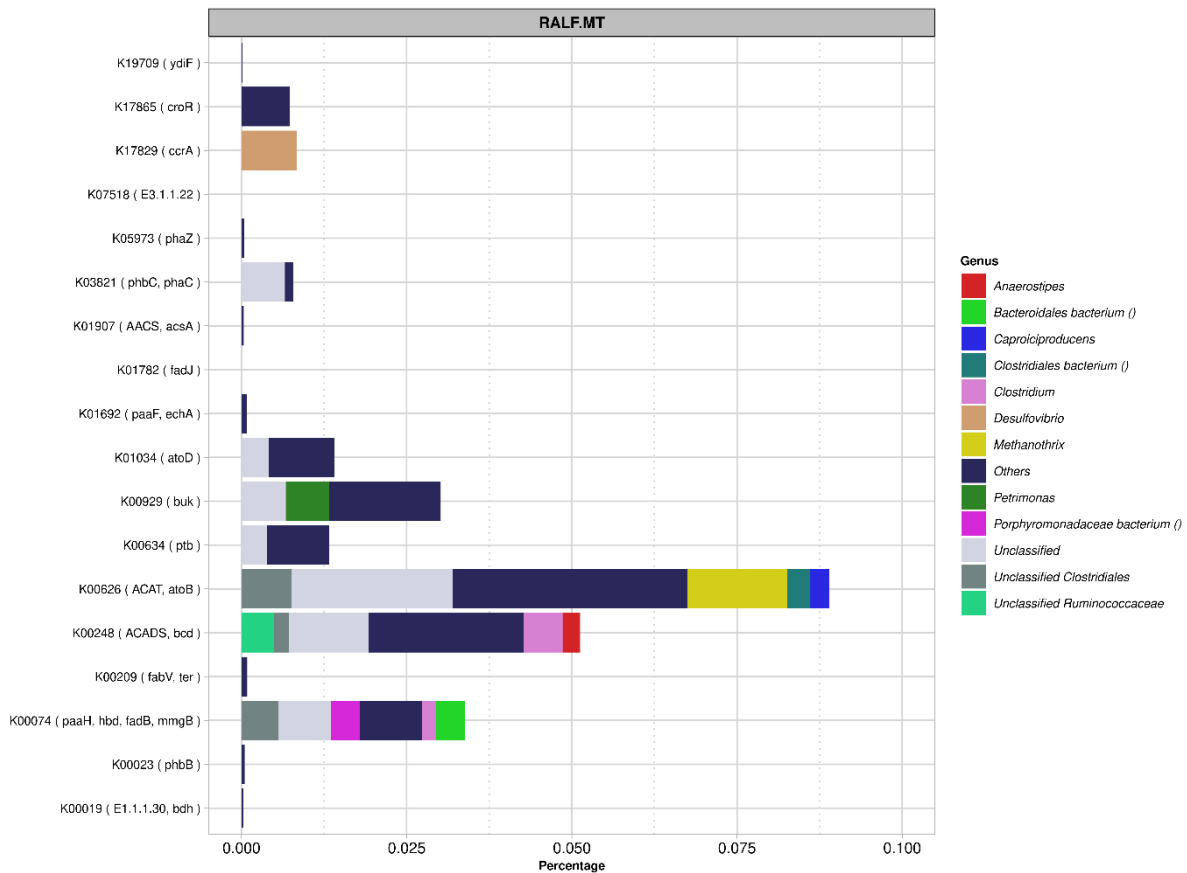


Figura 27. Atribuição de taxonomia aos KO do metabolismo de butanoato na amostra do RALF-MT

O gene butyryl-CoA dehydrogenase (K00248) codifica a enzima que catalisa a conversão de butanoyl-CoA em crotonoyl-CoA na degradação de HBU. Por outro lado, esta mesma desidrogenase converte propanoyl-CoA em acryloyl-CoA. A identificação desta enzima pode indicar a degradação de HLa oriundo da vinhaça pela rota do acrilato, em que o HLa é convertido em HPr. Esta hipótese poderia ser reforçada pela identificação dos genes propionate CoA-transferase (K01026, EC:2.8.3.1), de conversão de HLa em lactoyl-CoA, e lactoyl-CoA dehydratase subunit alpha (K20626, EC:4.2.1.54), de conversão de lactoyl-CoA em acryloyl-CoA. No entanto, o KO associado a lactoyl-CoA dehydratase subunit alpha não foi identificado na amostra do RALF-MT e implica que o HLa afluente ( $205 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi degradado a partir da conversão de D-Lactato (K18930) e L-Lactato (K00016, EC:1.1.1.27) em piruvato. O KO com maior percentual foi o de conversão de D-Lactato em piruvato (0,046%). Porém, é válido mencionar que o percentual deste KO foi inferior ao da enzima que catalisa a degradação de

HLa em lactoyl-CoA (0,052%). Isto pode ter ocorrido porque esta enzima também catalisa a conversão de acetil-CoA em acetato.

Assim como a identificação do gene propionate-CoA-transferase (K01026, EC:2.8.3.1) pode estar relacionado à enzima de conversão de acetil-CoA em acetato, e não de HLa em lactoyl-CoA, a enzima que catalisa a conversão de propanoyl-CoA em acryloyl-CoA pode ser associada a degradação de HPr (Figura 28).

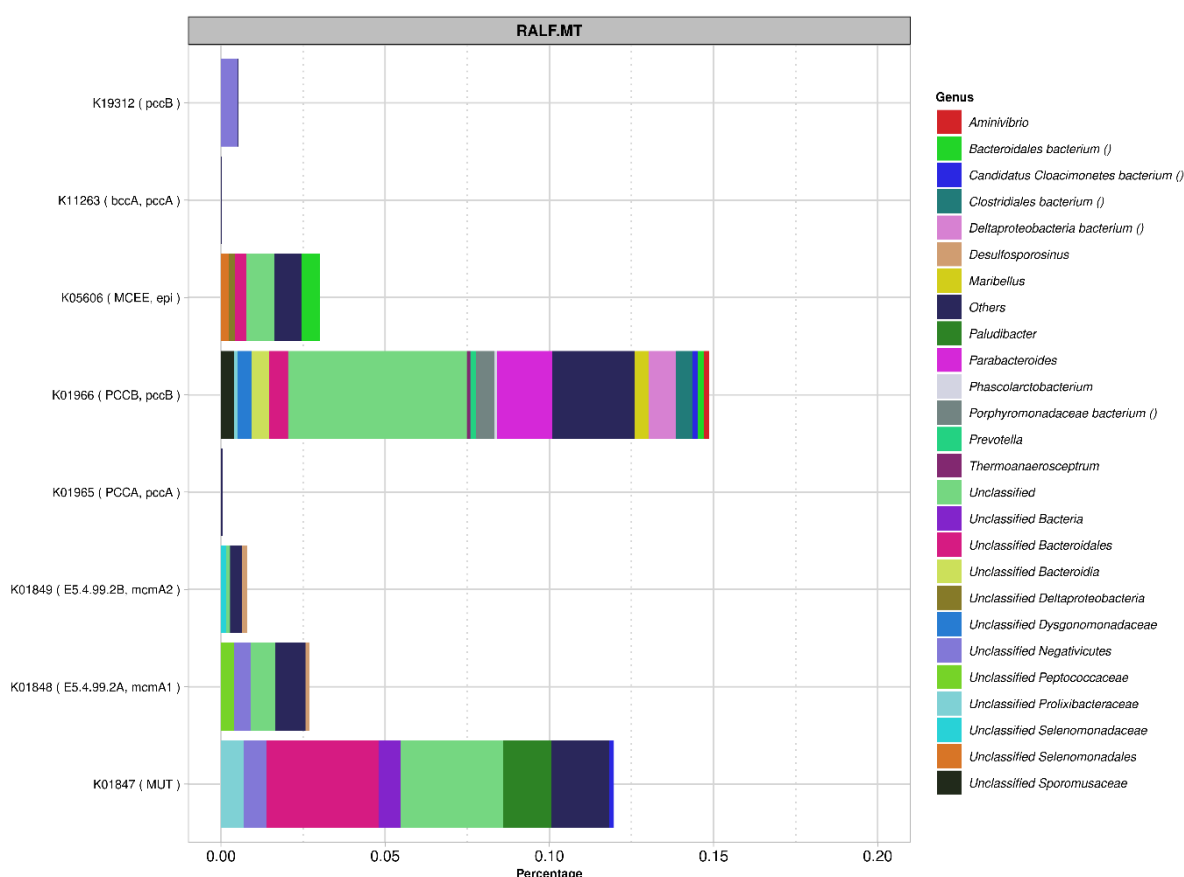


Figura 28. Atribuição de taxonomia aos KO do metabolismo de propanoato a partir da degradação de succinato na amostra do RALF-MT

O HPr pode ter sido formado no ciclo Wood-Werkman. De fato, os genes methylmalonyl-CoA/ethylmalonyl-CoA epimerase (K05606, EC:5.1.99.1) e methylmalonyl-CoA mutase (K01847, EC:5.4.99.2) foram identificados na amostra. A possível atividade destes genes implica que o succinyl-CoA e o methylmalonyl-CoA podem ter sido intermediários na conversão de succinato em HPr (FALENTIN et al., 2010). A elevada abundância de KO associado à EC:5.4.99.2 reforça esta hipótese. Além disso, foram identificados genes relacionados a enzimas que catalisam a síntese de succinato a partir do fumarato (K00244,

EC:1.3.5.4) e de fumarato a partir de malato (K01676, EC:4.2.1.2). Contudo, não foram identificados KO relacionados a genes de conversão de oxaloacetato à malato, mas sim de malato a partir de acetil-CoA (K01638, EC:2.3.3.9).

Ainda que os genes que indiquem a conversão de oxaloacetato a malato não tenham sido identificados na amostra do RALF-MT em 10 g DQO L<sup>-1</sup>, a síntese de HPr por meio da degradação de succinato também é corroborada pela identificação deste metabólito nas amostras de efluente (721 mg L<sup>-1</sup>) nesta condição operacional. Nesse sentido, a degradação de HPr, apesar da detecção nas amostras de efluente, também pode ser inferida pela identificação de KO associado ao gene methylmalonyl-CoA carboxyltransferase 5S subunit (K03416, EC:2.1.3.1-5S). Esta enzima catalisa a conversão de methylmalonyl-CoA em acetil-CoA. Por sua vez, o methylmalonyl-CoA pode ter sido originado a partir da conversão de acryloyl-CoA em 3-hydroxypropionyl-CoA (EC:4.2.1.17), de 3-hydroxypropionyl-CoA em 3-oxopropionyl-CoA e 3-oxopropionyl-CoA em methylmalonyl-CoA.

A conversão de HPr em acetato é termodinamicamente desfavorável ( $\Delta G^0$  igual a +71,6). Portanto, para que a degradação deste ácido ocorresse de forma exergônica foi necessária redução da pressão parcial de hidrogênio no RALF-MT. Nos estágios de acidogênese e acetogênese este consumo pode ser realizado por meio da produção de acetato por microrganismos autotróficos e por meio da sulfetogênese (SAADY, 2013). De fato, os KO que codificam enzimas relacionadas a via Wood-Ljungdahl (rota de redução do CO<sub>2</sub> utilizando hidrogênio) foram identificados no RALF-MT (K14138, K05299, K01938, K01491, K00297, K00198). Inclusive, os genes formate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>) alpha subunit (K05299, EC:1.17.1.10) e formate dehydrogenase major subunit (K00123, EC:1.17.1.9), associados à conversão de formato em CO<sub>2</sub> (vice-versa) na via Wood-Ljungdahl foram atribuídos ao metabolismo de microrganismos do gênero *Smithella*. É importante mencionar que *Smithella propionica* também é capaz de realizar a oxidação de HPr (DETMAN et al., 2021).

A utilização de hidrogênio como doador de elétrons na redução de sulfato também foi levantada como hipótese para a remoção de 1811 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup> em 10 g DQO L<sup>-1</sup> no RALF-MT. Esta redução do sulfato foi parcialmente corroborada pela detecção de microrganismos dos gêneros *Desulfovibrio* (11,3%) e *Desulfomicrobium* (2,6%) no reator. Microrganismos do gênero *Desulfovibrio* são relacionados à redução dissimilatória de sulfato, em que a adenosina-5'-fosfosulfato (APS) não é fosforilada a fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), mas é diretamente reduzida a sulfito (DWORKIN et al., 2006). No RALF-MT, foram identificados 4 KO diferentes e relacionados à redução dissimilatória de sulfato: dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (K11180, EC:1.8.99.5), dissimilatory sulfite reductase beta subunit (K11181,

EC:1.8.99.5), adenylylsulfate reductase, subunit A (K00394, EC:1.8.99.2) e adenylylsulfate reductase, subunit B (K00395, EC:1.8.99.2). Estes KO foram majoritariamente atribuídos a *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* e *Deltaproteobacteria*. Portanto, estes resultados estão de acordo com a classificação taxonômica e corroboram que o sulfato apresentou papel importante na degradação de HPr no reator.

A redução da concentração de hidrogênio também é comumente realizada por meio do consumo por arqueias hidrogenotróficas (PRASERTSAN et al., 2021). 53 KO diferentes relacionados à metanogênese foram identificados no RALF-MT. Porém, genes que codificam as enzimas formylmethanofuran dehydrogenase (EC:1.2.7.12) e formate dehydrogenase (coenzyme F420) (K00125, EC:1.17.98.3 1.8.98.6) e, portanto, associados à metanogênese hidrogenotrófica, foram menos abundantes no RALF-MT em relação aos de metanogênese acetotrófica (Figura 29). Além disso, os genes associados à metanogênese hidrogenotrófica foram majoritariamente relacionados ao metabolismo de *Methanobacterium* (2,6%), que foram identificadas em menor abundância relativa em relação à *Methanotherix* (15,1%) no reator. Estes achados sugerem que a metanogênese hidrogenotrófica pode ter sido parcialmente substituída pela homoacetogênese e sulfetogênese na captação de hidrogênio no RALF-MT. O KO mais abundante no RALF-MT foi o relacionado ao gene que codifica a enzima acetyl-CoA synthetase (K01895, EC:6.2.1.1). Esta é uma enzima chave na metanogênese acetoclástica pois participa da síntese de acetyl-CoA a partir de acetato (PRASERTSAN et al., 2021).

Na Figura 30 estão apresentadas as possíveis vias para a digestão de glicerol, carboidratos, HLa e HBU no RALF-MT. Em suma, a elevada biodegradabilidade do glicerol pode ter contribuído para a síntese de HPr no RALF-MT. A síntese de HPr é comumente associada ao desenvolvimento de arqueias hidrogenotróficas (DETMAN et al., 2021) e inibição de *Methanosarcina* (PRASERTSAN et al., 2021). De fato, no RALF-MT foi observada baixa abundância relativa de *Methanosarcina* (< 0,09%). Entretanto, a abundância relativa de arqueias hidrogenotróficas e a baixa predominância de KO relacionados a essa rota (Figura 29) indicam que o consumo de hidrogênio pode ter ocorrido por meio da produção autotrófica de acetato e por bactérias redutoras de sulfato (Equação 5.3). Nesse sentido, a composição da vinhaça foi determinante para os processos no reator. O consumo hidrogênio por bactérias redutoras de sulfato foi possibilitado pela elevada concentração de sulfato afluente. Além disso, a heterogeneidade da composição da vinhaça pode ter contribuído para que a degradação dos compostos não ocorresse de forma simultânea. Desta maneira, a produção e o consumo de acetato por *Methanotherix* foi suficientemente balanceado no reator e evitou o acúmulo de acetato em níveis inibitórios para microrganismos deste gênero.

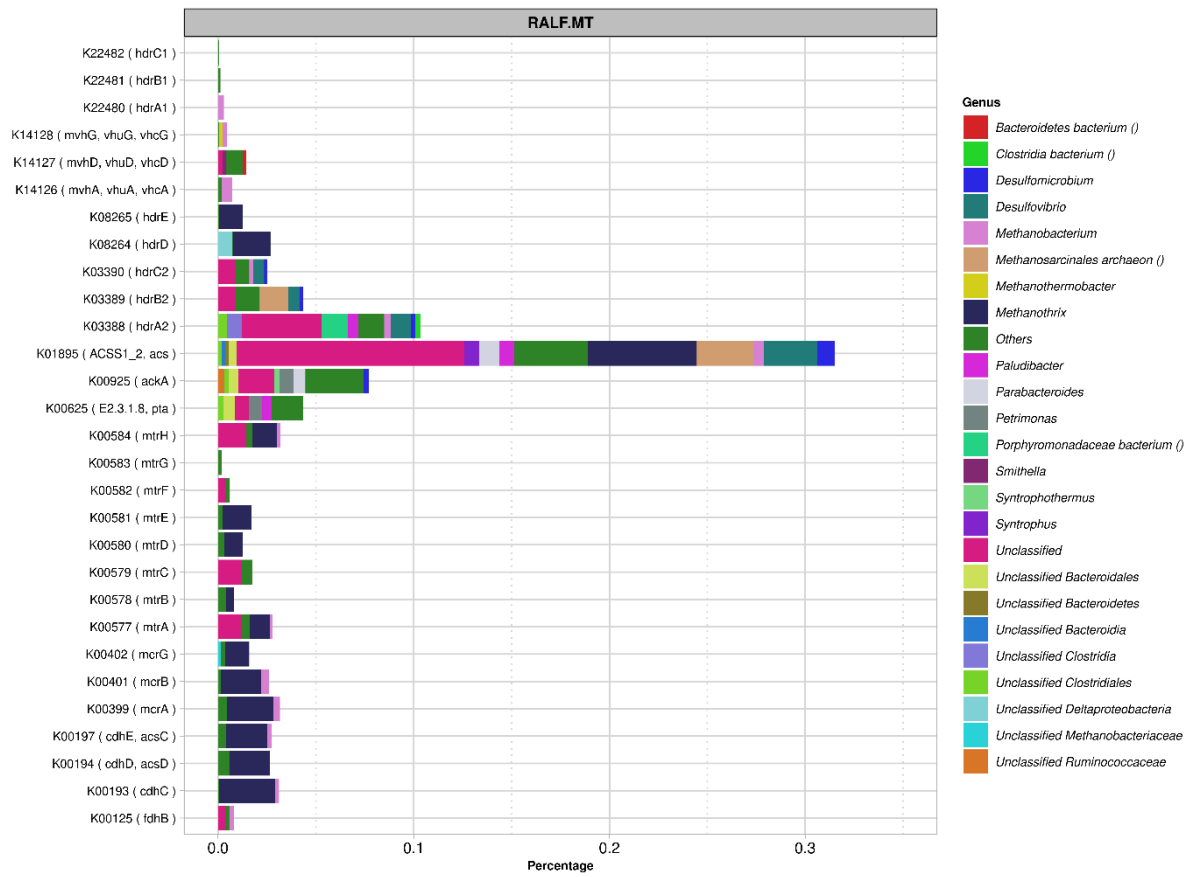


Figura 29. Atribuição de taxonomia aos KO do metabolismo de metano na amostra do RALF-MT



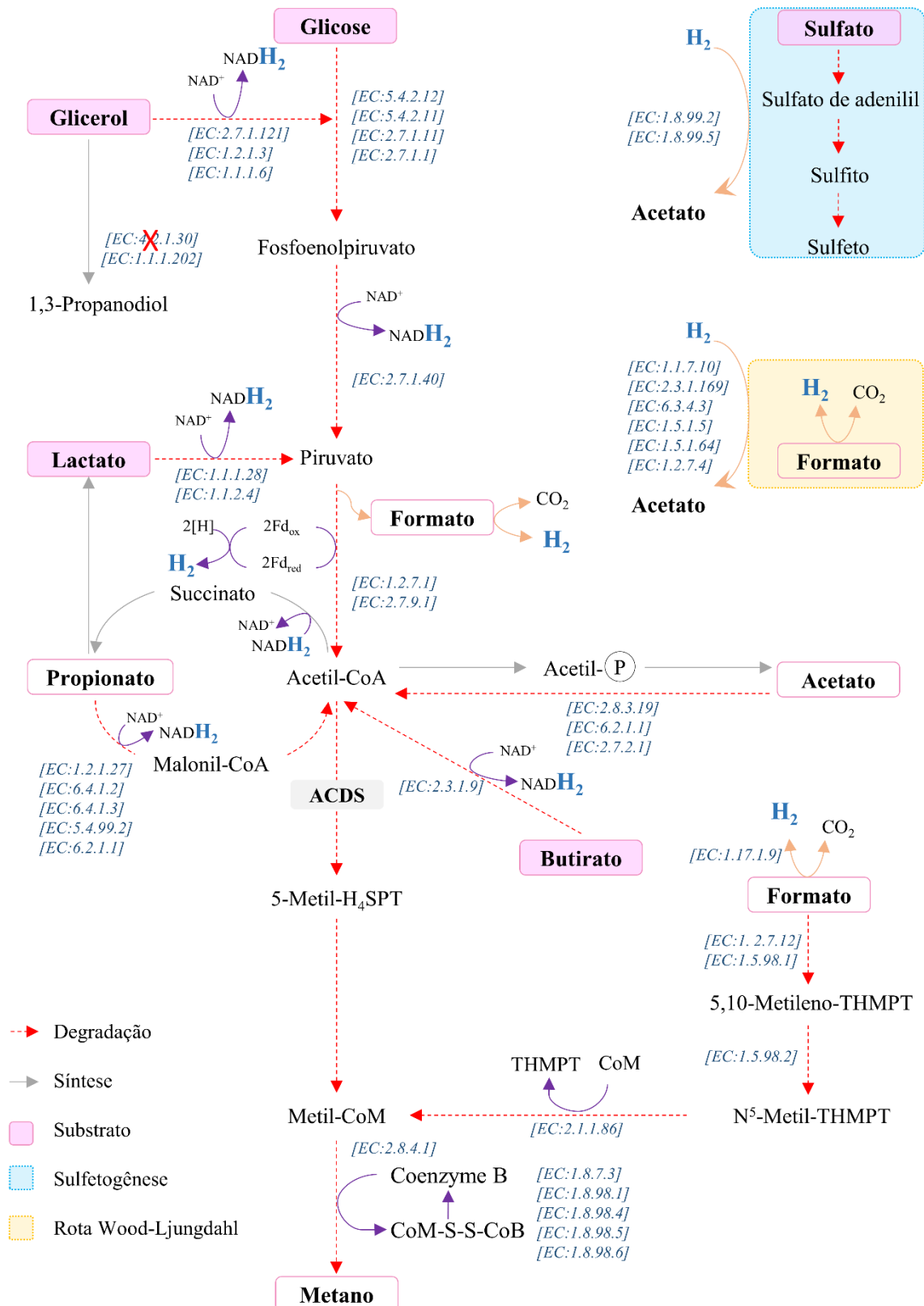


Figura 30. Possíveis vias para a digestão de glicerol, carboidratos e HLa no RALF-MT. Os números entre chaves representam os EC (Números da Comissão de Enzimas) para os principais KO identificados e os valores em parêntesis são as abundâncias relativas dos principais gêneros identificados na amostra de  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

## 5.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS: RALF-AT

Nesta seção são apresentados os resultados do efeito do aumento da TCO de 60 para 90 e 120 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>, pelo aumento da concentração total de vinhaça e glicerina (proporção 50%: 50% em base DQO) de 10 para 20 g DQO L<sup>-1</sup>, na produção de hidrogênio e metabólitos solúveis no RALF-AT. Como foi previamente explicitado, a TCO inicial foi determinada com base em estudos prévios da digestão de vinhaça de cana-de-açúcar que apontaram resultados ótimos de HY entre 60 e 80 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> em RALF (SANTOS et al., 2014c, 2014a, 2014b; RAMOS; SILVA, 2017; REGO et al., 2020). Adicionalmente, o aumento da TCO para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup> (60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> atribuído ao glicerol e 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> atribuído à vinhaça) foi realizado com o intuito de observar os efeitos do aumento da concentração de matéria orgânica biodegradável na produção de hidrogênio, uma vez que, a falha da fermentação de vinhaça é associada a compostos tóxicos nesse substrato (SANTOS et al., 2014a; REGO et al., 2020).

### 5.2.1 Efeito do aumento da TCO no desempenho fermentativo do RALF-AT

O pH do tanque de alimentação do RALF-AT foi mantido em  $5,2 \pm 0,8$  e com isso o pH efluente permaneceu em  $4,7 \pm 0,2$  em todas as TCOs aplicadas. Como apontado por Espinoza-Escalante et al. (2008) ao avaliar o efeito da temperatura (35 °C e 55 °C) e do pH na fermentação de vinhaça de tequila, o pH foi o fator mais importante na produção de hidrogênio. O maior acúmulo de ácidos ocorreu em 55 °C e pH 4,5, além disso, o pH 5,5 foi indicado como ótimo para produção de H<sub>2</sub> sob condição termofílica (ESPINOZA-ESCALANTE et al., 2008). O pH de 5,5 foi apontado por Silva-Illanes et al. (2017) como ótimo para produção de hidrogênio a partir de glicerol em CSTR mesofílico. Similarmente, o pH ótimo de 5,5 foi indicado por Sittijunda e Reungsang (2012) (que avaliaram pH entre 4,0 e 8,0); Faber e Ferreira-Leitão (2016) (que avaliaram pH entre 4,8-8,2); e García e Cammarota (2019) (que avaliaram pH entre 4,0 – 5,5) para produção de hidrogênio a partir de glicerol.

Simões et al. (2021) avaliaram o efeito do aumento da TCO na fermentação de glicerol em RALFs mesofílico (30 °C) e termofílico (55 °C) e observaram desempenho fermentativo constante do reator termofílico com pH mantido entre 4,5 e 5,1. O pH observado no RALF-AT está dentro da faixa relatada por Simões et al. (2021), e ambos se diferenciam do pH ótimo de 5,5 previamente reportado na literatura da produção de hidrogênio a partir de vinhaça (ESPINOZA-ESCALANTE et al., 2008) e glicerol (SILVA-ILLANES et al., 2017; GARCÍA;

CAMMAROTA, 2019). Wang e Wan (2009) sugeriram que as possíveis causas da falta de consenso entre o pH ótimo para produção de hidrogênio podem estar atribuídas ao tipo de inóculo e substrato. Contudo, Ramos e Silva (2017) observaram pH entre 4,6 e 5,0 na fermentação de vinhaça em RALF termofílico, bastante similar ao pH observado no RALF-AT e a faixa reportada por Simões et al. (2021). Então, a falta de consenso entre os valores de pH apontados na literatura podem também ser atribuída à configuração de reator utilizada. De fato, Shida et al. (2012) utilizaram RALF para fermentação de sacarose em duas faixas de pH diferentes: entre 3,7 e 4,1 (sem adição de tampão) e entre 5,1 e 5,5 (com adição de tampão). O reator com pH entre 3,7 e 4,1 apresentou melhor desempenho de produção de hidrogênio do que o reator com pH entre 5,1 e 5,5, mesmo que pH 5,5 seja atribuído a maiores valores de produção de hidrogênio em outras configurações de reator (PREETHI et al., 2019).

Na Tabela 19 estão apresentadas as concentrações de carboidratos e glicerina detectadas nas amostras de afluente e efluente do RALF-AT, e na Figura 31 estão apresentadas as conversões de carboidratos totais e glicerina e a remoção de matéria orgânica deste reator.

Tabela 19. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais e glicerina em função da TCO aplicada ao RALF-AT

<b>Etapa</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>aflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>eflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glic<sub>aflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glic<sub>eflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
1	60	456 ± 165	325 ± 117	5428 ± 727	2481 ± 332
2	90	1275 ± 312	740 ± 201	10691 ± 710	6583 ± 458
3	120	3047 ± 348	1054 ± 235	10306 ± 811	8748 ± 863

TCO: taxa de carregamento orgânico; C<sub>aflu/eflu</sub>: concentração de carboidratos afluente/efluente; Glic<sub>aflu/eflu</sub>: concentração de glicerol afluente/efluente.

A conversão média de carboidratos totais do RALF-AT em 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (40,3%) foi inferior às observadas na fermentação termofílica de vinhaça como único substrato em RALF (49,9% e 75,0%) na mesma TCO aplicada (SANTOS et al., 2014b; RAMOS; SILVA, 2017, 2020; REGO et al., 2020). Os valores observados na conversão de carboidratos ao aplicar vinhaça como mono-substrato levam à conclusão de que a sua fermentação em RALF termofílico não é reprodutível, uma vez que, variou de 49,9% no estudo de Santos et al. (2014b) até 75,0% no estudo de Rego et al. (2020). Contudo, os lotes de vinhaça utilizados na alimentação dos RALFs de Santos et al. (2014b) e Rego et al. (2020) apresentaram concentração

média de carboidratos iguais a  $5650 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3986 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, resultando em valores absolutos de conversões de carboidratos similares. Nesse tipo de análise de dados é possível concluir que a conversão de  $130 \text{ mg L}^{-1}$  de carboidratos no RALF-AT foi inferior à observada em mono-fermentação de vinhaça. Por outro lado, a conversão de carboidratos foi acompanhada por conversão de  $2497 \text{ mg L}^{-1}$  de glicerol no RALF-AT, similar à conversão de glicerol como mono-substrato em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no RALF termofílico do estudo de Simões et al. (2021) ( $2600 \text{ mg L}^{-1}$ ).

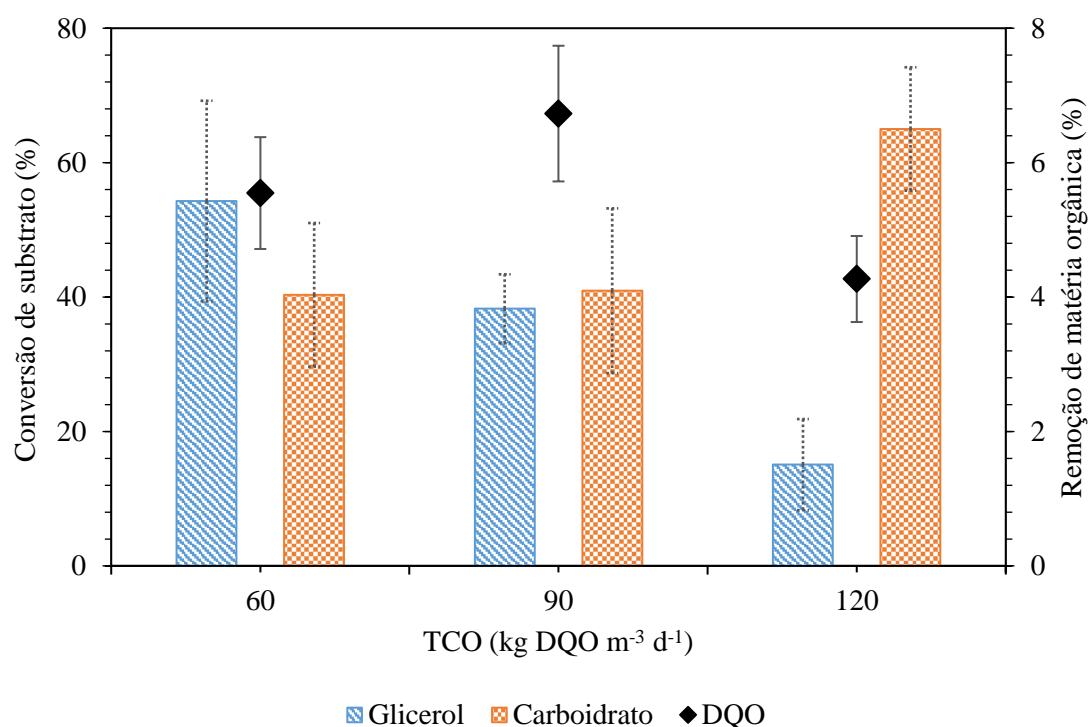


Figura 31. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-AT

A conversão de glicerol superior à conversão dos constituintes da vinhaça em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  é esperada e pode ser atribuída ao fato de que o glicerol é facilmente biodegradável (MEIER et al., 2020a), enquanto a vinhaça contém compostos recalcitrantes que podem reduzir sua conversão (GODOI et al., 2019). Fuess et al. (2019) observaram que a conversão de glicerol foi de 98,3% em TCO igual a  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  na fermentação de vinhaça em AnSTBR termofílico. Em contrapartida, as conversões de HLa e carboidratos permaneceram em 63,6% e 54,2%, respectivamente, em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019). Piffer et al. (2021) relacionaram a maior conversão de glicerol em relação aos carboidratos presentes na vinhaça à utilização do glicerol como fonte de carbono

para crescimento celular. De fato, Fountoulakis e Manios (2009) apontaram que o suprimento de fonte de carbono com elevada biodegradabilidade favorece o aumento da biomassa dentro do reator. Os autores realizaram a co-fermentação da fração orgânica dos resíduos municipais e glicerol e reportaram que o crescimento de biomassa teve relação direta com o aumento da degradação dos substratos. Ainda, Silva et al. (2017) relataram que a adição de glicerol na fermentação de resíduos alimentares ocasionou em redução do tempo necessário para aclimatação dos microrganismos. Portanto, em baixa concentração afluyente de carboidratos no RALF-AT em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $131 \text{ mg L}^{-1}$ ) os microrganismos utilizaram o glicerol tanto como fonte de carbono para crescimento celular quanto como substrato nas vias metabólicas.

A conversão de carboidratos permaneceu constante ao aumentar a TCO de 60 para  $90 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Figura 31), porém, o mesmo aumento na TCO levou à redução da remoção de glicerol de 54,3% para 38,3%. O aumento da TCO para  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi acompanhado do aumento da conversão de carboidratos para  $65,0 \pm 9,2\%$  e redução da conversão de glicerol para  $15,1 \pm 6,8\%$ . Além disso, foi observada conversão de 75, 174 e  $361 \text{ mg L}^{-1}$  do HLa oriundo da vinhaça em 60, 90 e  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Então, considerando os valores absolutos, foi observado aumento da conversão dos constituintes degradáveis da vinhaça (carboidratos e HLa) de 226 para  $2622 \text{ mg DQO L}^{-1}$  e redução da conversão de glicerol de 3588 para  $1897 \text{ mg DQO L}^{-1}$  ao aumentar a TCO para  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

O aumento da conversão de carboidratos e redução da conversão de glicerol no RALF-AT ao aumentar a TCO para  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  pode ser relacionado a maior biodegradabilidade do lote de vinhaça utilizado. A relação carboidratos totais/DQO da vinhaça utilizada em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi de  $0,22 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ DQO}$  e a relação da vinhaça utilizada em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi de  $0,08 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ DQO}$ . Portanto, a baixa concentração de carboidratos na vinhaça em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  levou à utilização do glicerol como principal fonte de carbono para crescimento celular e substrato nas vias metabólicas. Por outro lado, a elevada concentração de carboidratos na vinhaça em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  acarretou redução da necessidade de utilização do glicerol como substrato. Similarmente, ao fermentar o glicerol com fonte de carbono de elevada biodegradabilidade, como o soro de queijo, Lovato et al. (2017b, 2017a, 2018) e Lopes et al. (2017) observaram maiores valores de conversão de carboidratos em relação ao glicerol.

A conversão mais rápida de substrato mais facilmente biodegradável foi observada por Lopes et al. (2020) na fermentação de  $4 \text{ g DQO L}^{-1}$  de glicose e xilose (proporção 50%: 50%) como cossustratos em RALF termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os autores relataram que a conversão de

glicose permaneceu em 99% em TDH de 4 h, enquanto a conversão de xilose foi de 7,3%, e justificaram que esta ocorrência é importante para evitar acidificação rápida do reator e depleção total da fonte de carbono. Adicionalmente, a inserção de um cossustrato pode promover complementaridade de nutrição e resultar em maior conversão de um determinado substrato quando comparada à sua mono-digestão (RAMOS; SILVA, 2018). No RALF-AT em TCO igual a  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , na qual foi observada conversão de carboidratos de 65%,  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  ( $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) foram atribuídos à vinhaça. Nesta TCO a conversão média de carboidratos foi superior às observadas na fermentação de  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  ( $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) de vinhaça como mono-substrato em RALFs termofílicos nos estudos de Santos et al. (2014b) (49,9%) e Ramos e Silva (2020) (61,2%).

Pereyra et al. (2020) observaram que o aumento da adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  para  $3 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol em concentração fixa de melão de  $4 \text{ g L}^{-1}$  em RALF mesofílico levou ao aumento da conversão de carboidratos de 35,7% para 86,5%. O aumento da conversão de carboidratos no estudo dos autores pode ter ocorrido devido a utilização do glicerol como fonte de carbono para crescimento celular, e do melão como substrato majoritário de obtenção de energia nas vias metabólicas. Então, nos casos do RALF do estudo de Pereyra et al. (2020) e do RALF-AT, o aumento da biomassa ativa dentro dos reatores viabilizou maiores conversões de carboidratos. É notável que a concentração média de SSV no efluente do RALF-AT em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Tabela 20) foi superior às concentrações de SSV observadas nas fermentações de glicerina ( $102 \text{ mg L}^{-1}$ ) (SIMÕES et al., 2021) e vinhaça ( $365 \text{ mg L}^{-1}$ ) (SANTOS et al., 2014b) como mono-substratos em RALFs termofílicos na mesma TCO aplicada. Tal ocorrência valida a hipótese de que a co-fermentação proporciona aumento da biomassa ativa dentro do reator.

Tabela 20. Valores médios da concentração de sólidos nas amostras de efluente do RALF-AT em função da TCO aplicada

<b>Etapa</b>	<b>TCO</b> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>SST</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>SSF</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>SSV</b> (mg L <sup>-1</sup> )
1	60	313 ± 77	32 ± 9	281 ± 1
2	90	407 ± 94	88 ± 28	319 ± 78
3	120	969 ± 99	70 ± 44	899 ± 65

SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos; SSV: sólidos suspensos voláteis.

O desempenho do RALF-AT em relação à produção de hidrogênio está apresentado na Tabela 21. Adicionalmente, o efeito do aumento da TCO na fração molar de hidrogênio no biogás, na PVH e no HY são visualizados na Figura 32, Figura 33 e Figura 34, respectivamente.

Tabela 21. Produção de hidrogênio no RALF-AT em função da TCO aplicada

<b>Etapa</b>	<b>TCO</b> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>%H<sub>2</sub></b>	<b>PVH<sub>leito</sub></b>	<b>PVH<sub>reator</sub></b>	<b>HY</b>
1	60	30,3 ± 7,5	690 ± 59	412 ± 69	0,18 ± 0,03
2	90	32,2 ± 7,4	1219 ± 250	901 ± 200	0,27 ± 0,06
3	120	11,1 ± 2,9	1851 ± 404	1295 ± 288	0,29 ± 0,06

%H<sub>2</sub>: percentual de hidrogênio no biogás; PVH<sub>leito</sub>: produção volumétrica de hidrogênio por volume de leito fluidificado (mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> leito); PVH<sub>reator</sub>: produção volumétrica de hidrogênio por volume total de reator (mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> reator); HY: rendimento de hidrogênio (mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>adicionada</sub>).

Os valores médios de %H<sub>2</sub> em TCOs de 60 e 90 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foram similares (Tabela 21) e coincidentes com o padrão de conversão de substratos no RALF-AT, ou seja, o desempenho fermentativo do reator nessas TCOs permaneceu inalterado. Por outro lado, o aumento da TCO para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> ocasionou redução do %H<sub>2</sub> de 32,2% para 11,1%, consoante com a redução da conversão de glicerol e aumento da conversão de carboidratos (Figura 31). De fato, os valores de %H<sub>2</sub> observados em mono-fermentação de glicerol (61% - 78,5%) (LO et al., 2013; SILVA-ILLANES et al., 2017; SIMÕES et al., 2021) são superiores

aos observados em mono-fermentação de resíduos de destilaria (22,8% - 57,1%) (INTANOO et al., 2012; FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; SANTOS et al., 2014b). Isto provavelmente ocorre devido à natureza de cada fonte de carbono, ou seja, a metabolização do glicerol (composto com 3 carbonos) ocasiona em menor liberação de  $\text{CO}_2$  do que a metabolização dos carboidratos presentes na vinhaça (compostos com mais de 6 carbonos). Então, a fermentação do glicerol leva a biogás com maior pureza de hidrogênio do que a fermentação de vinhaça. Adicionalmente, Ramos e Silva (2020) indicaram que os compostos inibitórios presentes na vinhaça foram responsáveis por  $\% \text{H}_2$  igual a 23,9% na fermentação de  $10 \text{ g DQO L}^{-1}$  deste substrato em RALF termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), valor baixo e similar aos observados do RALF-AT.

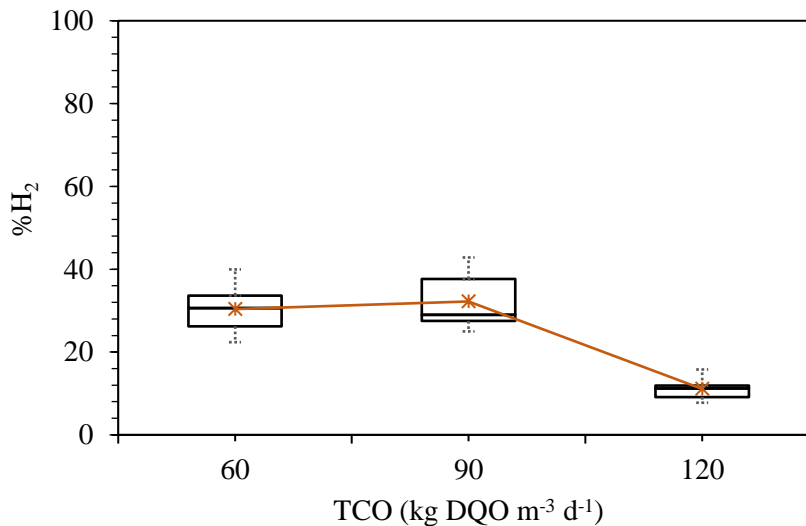


Figura 32. Efeito do aumento da TCO no  $\% \text{H}_2$  no biogás do RALF-AT

A atribuição do  $\% \text{H}_2$  do RALF-AT à maior fração molar de  $\text{CO}_2$  pode ser feita a partir da observação da ausência de metano no biogás. Por sua vez, a ausência de metano pode ser associada a efetividade do tratamento térmico + resfriamento na eliminação das arqueias. Além disso, o controle biocinético ( $\text{pH} < 5,0$ ) foi efetivo para evitar reestabelecimento das arqueias durante a operação à longo prazo do RALF-AT ao avaliar o efeito da TCO na co-fermentação de vinhaça e glicerol (478 dias). Apesar da ausência de metano no biogás, os valores de  $\text{PVH}_{\text{leito}}$  ( $690 - 1851 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}_{\text{leito}}$ ) (Figura 33) e  $\text{HY}$  ( $0,18 - 0,29 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) observados no RALF-AT foram inferiores aos observados nas fermentações de glicerol e vinhaça como mono-substratos em RALFs termofílicos (Tabela 22). Tal fato pode estar associado: i) a rota redutiva exclusiva da fermentação de glicerol que leva a baixos valores de  $\text{HY}$  (discutido no item 5.2.2); ii) ao aumento da TCO pelo aumento da concentração de



cossustratos no RALF-AT (e não pela redução do TDH); e iii) a maior concentração de biomassa ativa na co-fermentação em relação as fermentações de vinhaça e glicerol como mono-substratos.

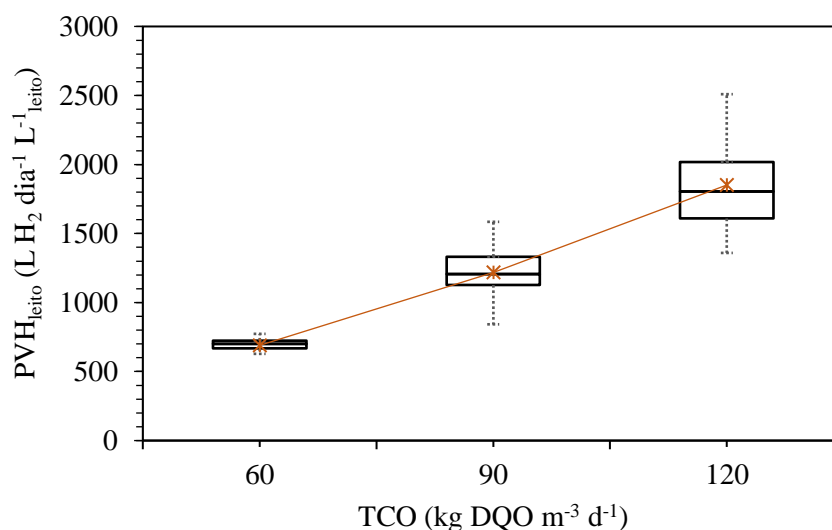


Figura 33. Efeito do aumento da TCO na PVH do RALF-AT

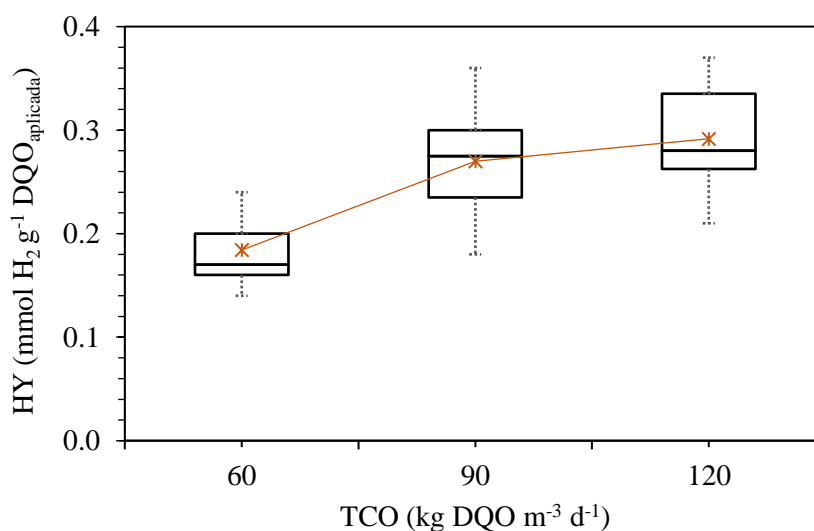


Figura 34. Efeito do aumento da TCO no HY do RALF-AT

Os valores de HY observados no RALF-AT foram significativamente inferiores aos relatados em estudos que realizaram fermentação de vinhaça como único substrato em RALFs termofílicos (55 °C) (Tabela 22). Porém, nesses estudos o aumento da TCO foi realizado pela redução do TDH com concentrações de vinhaça fixas em 10, 15, 20 e 30 g DQO L<sup>-1</sup> (SANTOS

et al., 2014a, 2014b; RAMOS; SILVA, 2017; REGO et al., 2020). No caso da redução do TDH a carga é acrescida mantendo a concentração de compostos inibitórios do substrato também fixa, o que reduz a ocorrência de efeito deletério aos microrganismos. Por outro lado, ao aumentar a concentração de substratos em TDH fixo ocorre também o aumento da concentração de compostos inibitórios inerentes do substrato (OTTAVIANO et al., 2017). Por este motivo os valores de  $PVH_{leito}$  ( $35.760 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) e HY ( $2,23 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{aplicada}$ ) ao aplicar vinhaça diluída para  $15 \text{ g DQO L}^{-1}$  foram 2-vezes maiores do que os observados na aplicação de  $30 \text{ g DQO L}^{-1}$  ( $19.440 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $0,79 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{aplicada}$ ), ambos em  $360 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (SANTOS et al., 2014a, 2014b).

Tabela 22. Fermentação de vinhaça e glicerina como mono e cossustratos em RALFs termofílicos

Substrato	Concentração	PVH <sub>leito</sub>	HY	Referência
	$\text{g L}^{-1}$	$\text{mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}_{leito}$	$\text{mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{adicionada}$	
Vinhaça	10	47.040 (240)	2,86 (60)	(SANTOS et al., 2014b)
	30	19.440 (360)	0,79 (120)	
	15	35.760 (360)	2,23 (60)	(SANTOS et al., 2014a)
	20	28.800 (480)	1,85 (80)	
	10	17.040 (480)	1,64 (60)	(RAMOS; SILVA, 2017)
	10	1300 (60)	0,34 (60)	(RAMOS; SILVA, 2020)
	5	6400 (60)	1,06 (60)	(REGO et al., 2020)
	20	870 (120)	0,32 (120)	(RAMOS et al., 2021)
Glicerol	10	35.040 (480)	1,74 (240)	(SIMÕES et al., 2021)
Vinhaça	10	690 (60)	0,18 (60)	RALF-AT
+	15	1219 (90)	0,27 (90)	RALF-AT
Glicerol	20	1851 (120)	0,29 (120)	RALF-AT

PVH<sub>leito</sub>: produção volumétrica de hidrogênio por volume de leite fluidificado; HY: rendimento de hidrogênio; o número em parêntesis corresponde a TCO ótima para as variáveis resposta PVH<sub>leito</sub> e HY.

O pressuposto de que o desempenho observado ao aumentar a TCO pelo aumento da concentração de substrato se diferencia do desempenho ao reduzir o TDH é confirmado pelos estudos de Ramos et al. (2020) e Ramos et al. (2021). Os autores utilizaram RALF termofílico (55 °C) para avaliar a produção de hidrogênio a partir de vinhaça com concentrações iguais a 10, 15 e 20 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 4 h. As condições operacionais aplicadas por Ramos et al. (2020) e Ramos et al. (2021) foram similares às aplicadas ao RALF-AT, e retornaram resultados diferentes dos observados por Santos et al. (2014a, 2014b) e Ramos e Silva (2017), porém, comparáveis aos da co-fermentação com glicerol (Tabela 22). Neste caso, enquanto Ramos et al. (2021) observaram decréscimo da PVH<sub>leito</sub> de 1400 para 870 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>leito</sub> ao incrementar a TCO de 90 para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, este mesmo incremento de TCO no RALF-AT levou ao aumento da PVH<sub>leito</sub> de 690 para 1851 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>leito</sub>. Então, ao observar o aumento da TCO pelo aumento da concentração de substratos em particular, a inserção de glicerol forneceu maior robustez para o sistema sem apresentar tendência de falha do reator pela aplicação de TCOs superiores a 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

A inferência de que elevadas concentrações de biomassa ativa foram mantidas devido à co-fermentação de vinhaça e glicerol são diretamente associadas à possibilidade de aplicação de TCOs mais elevadas no RALF-AT. Isto pode ser verdade porque a redução da inibição por substrato é frequentemente relacionada ao aumento da concentração de microrganismos nos reatores (ELBESHISHY et al., 2017). Por outro lado, é possível observar uma relação inversamente proporcional entre o aumento da concentração de biomassa nos reatores e a produção de hidrogênio (BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021; SIMÕES et al., 2021). Simões et al. (2021) atribuíram a baixa conversão de glicerol bruto (< 26%) em RALF termofílico à redução da concentração de biomassa ativa no reator devido aos compostos inibitórios neste substrato. No entanto, os HY permaneceram estáveis e relativamente elevados (0,55 e 1,20 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol) na fermentação termofílica de glicerol em todas as TCOs aplicadas (30 - 480 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) (SIMÕES et al., 2021). Bernal, de Menezes e Silva (2021) associaram a ausência de hidrogênio na fermentação de vinhaça em reatores EGSB mesofílicos (30 °C) à elevada concentração de biomassa nesta configuração de reator. Segundo os autores, a ausência ou baixos valores de HY (~0,34 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>), similar ao observado no RALF-AT, foram acompanhados de elevada acidificação do reator e possibilidade de aplicação de TCOs tão elevadas quanto 720 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Outras configurações de reatores com elevada retenção de biomassa como o AnSTBR e o APBR retornaram valores máximos de PVH<sub>reator</sub> iguais a 527 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub> (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014), 762 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub> (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT,

2015a), 2074 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub> (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019), 630 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub> (NIZ et al., 2019) e 401 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub> (PIFFER et al., 2021). Os valores de PVH<sub>reator</sub> de reatores, em que ocorre maior acúmulo de biomassa, foram similares aos observados no RALF-AT (412 a 1295 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub>). Isto corrobora a linha de raciocínio adotada para a co-fermentação de vinhaça e glicerol neste reator. Neste caso, a probabilidade de maior acidificação pelo aumento da concentração de biomassa ativa do RALF-AT pode ser mais vantajosa para o estágio metanogênico do que a obtenção de energia por meio da produção de hidrogênio no reator acidogênico.

### 5.2.2 Efeito do aumento da TCO na distribuição de metabólitos líquidos no RALF-AT

A distribuição de metabólitos no RALF-AT seguiu a tendência observada na conversão de substratos e produção de hidrogênio, ou seja, de pouca alteração no desempenho fermentativo ao aumentar a TCO de 60 para 90 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e alteração significativa ao incrementar a TCO para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 35).

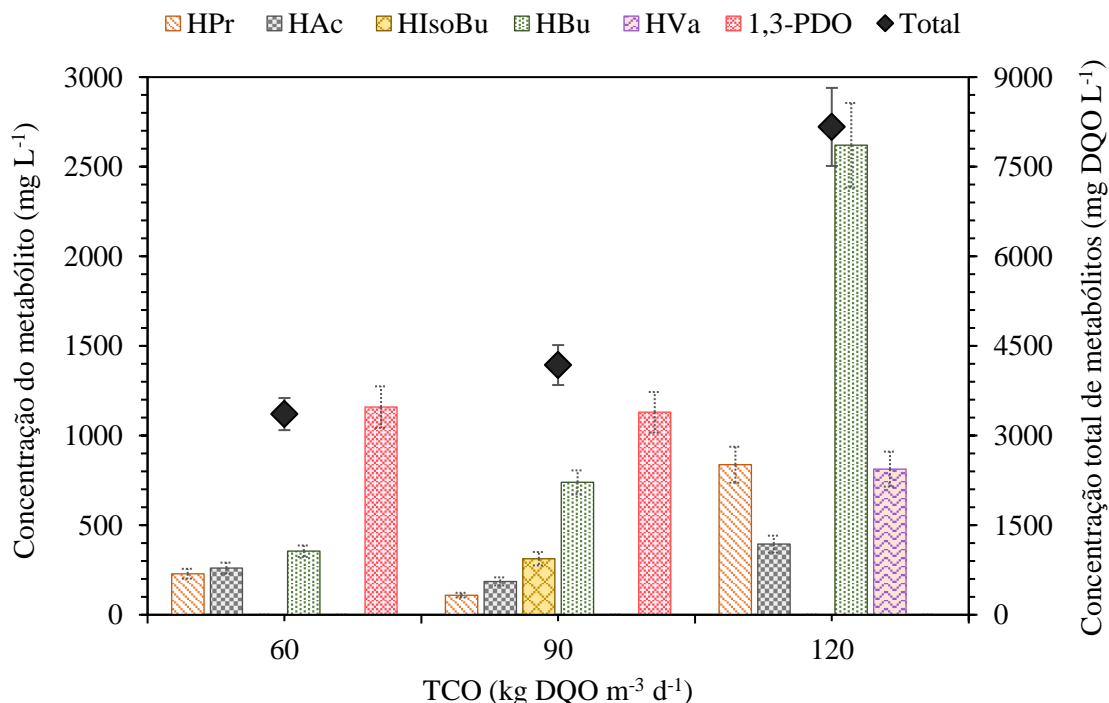
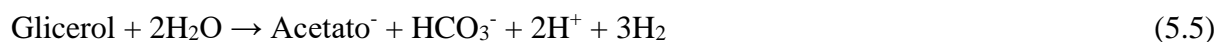


Figura 35. Efeito do aumento da TCO na produção de metabólitos líquidos no RALF-AT

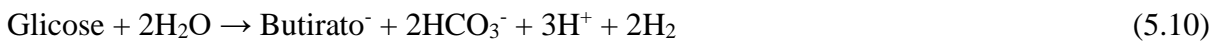
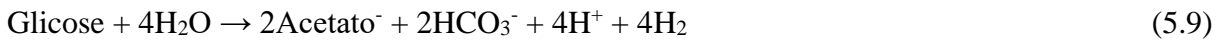
O 1,3-PDO foi o metabólito predominante nas amostras de efluente do RALF-AT (54% de todos os metabólitos gerados) em 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Isto é condizente com a elevada

conversão de glicerol (3588 mg DQO L<sup>-1</sup>) em relação às conversões de carboidratos e HLa presentes na vinhaça (226 mg DQO L<sup>-1</sup>) nesta condição. Como foi previamente discutido, o glicerol foi utilizado tanto como fonte de carbono para crescimento celular quanto como substrato nas vias metabólicas em 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. A dismutação de glicerol pela via oxidativa pode ter levado à geração de HPr (11%), HAc (15%) e HBU (14%) (Equações (5.5) – (5.7)). Por sua vez, o NADH gerado no ramo oxidativo foi regenerado a NAD<sup>+</sup> na geração de 1,3-PDO (Equação (5.8)). Além disso, a geração de ATP pode ter sido aplicada na formação de biomassa. Neste caso, como o estado reduzido do carbono do glicerol é inferior ao da biomassa, a geração de biomassa a partir de glicerol também resultou em NADH a ser regenerado pela produção de 1,3-PDO (SILVA et al., 2017). Isto poderia explicar o Y<sub>1,3-PDO</sub> em 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (0,48 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) similar aos observados por Nazareth et al. (2018) (0,45 g 1,3-PDO g<sup>-1</sup> glicerol), Paranhos e Silva (2018) (0,31 g 1,3-PDO g<sup>-1</sup> glicerol), Veras et al. (2019) (0,48 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol), Moscoviz, Trably e Bernet (2016) (0,52 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) e Gallardo et al. (2014) (0,47 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol), que realizam a fermentação de glicerina em condições operacionais estabelecidas para favorecimento da rota redutiva.



O perfil de metabólitos em 60 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> justifica o baixo HY nesta condição operacional (0,18 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>), uma vez que, as gerações de 1,3-PDO e hidrogênio são concorrentes. Pela ótica de produção de hidrogênio em sistemas de co-fermentação, o glicerol é associado ao aumento do HY devido à geração de HBU (MEIER et al., 2020a). Porém, Rodrigues et al. (2019) indicaram que a impureza presente no GR desencadeia a geração de 1,3-PDO. No caso da co-fermentação de glicerol e vinhaça, então, as impurezas que levaram ao aumento da atividade da rota redutiva foram os compostos recalcitrantes presentes na vinhaça. Além disso, as metabolizações de carboidratos em HAc (Equação (5.9)) e HBU (Equação (5.10)) podem ter contribuído para a maximização de NADH no sistema. Por sua vez,

o NADH pode ter sido regenerado tanto na formação de 1,3-PDO quanto na formação de HPr a partir de HLa (Equação (5.11)) e carboidratos (Equação (5.12)). Em suma, a co-fermentação de vinhaça e glicerol em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi prejudicial a recuperação de energia na forma de hidrogênio devido aos metabólitos formados (1,3-PDO e HPr).

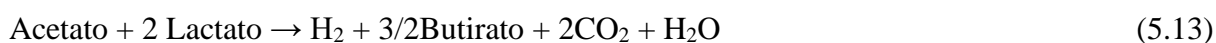


A fração molar de 1,3-PDO permaneceu estável em 47% ao aumentar a TCO de 60 para  $90 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $Y_{1,3\text{-PDO}}$  de  $0,33 \text{ mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}$ ). Porém, o mesmo aumento de TCO levou aos aumentos da PVH para  $901 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ reator}$  e do HY para  $0,27 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ . O aumento da produção de hidrogênio ao incrementar a TCO para  $90 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  pode estar associado ao aumento da conversão dos componentes da vinhaça de 226 para  $786 \text{ mg DQO L}^{-1}$ . Enquanto em  $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a produção de hidrogênio foi impedida pela conversão do glicerol e dos componentes da vinhaça em HPr e 1,3-PDO, em  $90 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi observada redução da concentração de HPr para  $110 \text{ mg L}^{-1}$  e aumento da concentração de HBU para  $739 \text{ mg L}^{-1}$ . Então, apesar da manutenção de atividade da rota redutiva devido a constância de conversão de glicerol, o incremento da produção de hidrogênio dependeu diretamente do metabólito obtido na rota oxidativa do glicerol e na metabolização da vinhaça. A rota oxidativa do glicerol e a fermentação de carboidratos levou à produção majoritária de HBU e HIsBU em  $90 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , rotas responsáveis pela geração de 2 mols de hidrogênio por mol de glicerol (Equação (5.6)) e de glicose (Equação (5.10)).

Sittijunda et al. (2020) realizaram a fermentação de  $25 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol em reator UASB termofílico ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e também observaram estabilidade da geração de 1,3-PDO entre 10,2 e  $9,2 \text{ g DQO L}^{-1}$  ao incrementar a TCO de 62,5 para  $75 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Entretanto, diferentemente do observado no RALF-AT, o HY observado no reator UASB decresceu de 2,05 para  $1,69 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$  no mesmo aumento de TCO. O comportamento do UASB termofílico valida o raciocínio abordado na co-fermentação de vinhaça e glicerol. Isto porque no RALF-AT foi observado aumento das produções de hidrogênio e HBU e redução da geração

de HPr. Porém, no reator UASB termofílico foi observada redução da produção de hidrogênio simultânea ao aumento da concentração de HPr de 0,26 para 0,51 g DQO L<sup>-1</sup> (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a). Simões et al. (2021) elencaram a importância dos metabólitos gerados na rota oxidativa do glicerol para a produção de hidrogênio. Enquanto no RALF mesofílico foi observado HPr e ácido capróico concomitantes ao 1,3-PDO e baixa produção de hidrogênio, no RALF termofílico o HY de 1,20 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol só foi possibilitado pela geração majoritária de HBU em relação ao 1,3-PDO (SIMÕES et al., 2021).

No RALF-AT, a geração de HBU pode ter ocorrido por meio de alongamento de HAC e HLa (Equação (5.13)), visto que esta é uma via frequente na fermentação de vinhaça (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021; SÁNCHEZ et al., 2021; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021a; PIFFER et al., 2021). Neste caso, a produção de hidrogênio por meio do alongamento de cadeia pode justificar a redução da concentração de HAC para 186 mg L<sup>-1</sup> e os baixos valores e HY observados em 90 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, pois esta via fornece 3 vezes menos hidrogênio do que a conversão direta de glicose em HBU (PIFFER et al., 2021).



O aumento da TCO para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> levou ao aumento da PVH de 901 para 1295 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> reator, provavelmente relacionado ao incremento da concentração de HBU de 739 para 2620 mg DQO L<sup>-1</sup>. Em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> também foi observada redução da remoção de glicerol de 5001 mg DQO L<sup>-1</sup> para 1897 mg DQO L<sup>-1</sup>, acompanhada de valores não detectáveis de 1,3-PDO. Por outro lado, a produção de hidrogênio nesta TCO também pode ser relacionada ao alongamento de cadeia de HAC e HLa em HBU, uma vez que, foi observado aumento da conversão de carboidratos e HLa para 2622 mg DQO L<sup>-1</sup>. Porém, o HY (0,29 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) permaneceu inferior aos observados na fermentação de vinhaça em RALF (Tabela 22). Santos et al. (2014a) observaram HY de 1,85 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub> simultâneo à fração molar de HBU igual a 22,9%. Por outro lado, os autores indicaram que ocorreu formação de HLa no RALF termofílico alimentado com vinhaça e a produção de hidrogênio foi obtida por meio da fermentação direta de carboidrato em HBU, diferentemente do que possivelmente ocorreu no RALF-AT.

A diferença de performance de produção de hidrogênio da co-fermentação de vinhaça e glicerol em relação à fermentação de vinhaça em RALF termofílico foi anteriormente atribuída ao aumento da TCO pelo aumento da concentração de cossustratos no RALF-AT, e não pela

redução do TDH. No estudo de Santos et al. (2014a), em que a TCO foi incrementada pelo decréscimo do TDH de 6 h para 1 h com concentração fixa de 20 g DQO L<sup>-1</sup>, ocorreu produção de hidrogênio pela conversão direta de carboidrato em H<sub>2</sub>. Porém no estudo de Ramos et al. (2021), em que a TCO foi incrementada pelo aumento da concentração de substratos de 15 para 20 g DQO L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 4 h, a produção de hidrogênio foi associada ao alongamento de HAc e HLa em H<sub>2</sub>. De fato, o HY observado em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> no RALF-AT (0,29 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>) foi similar ao observado por Ramos et al. (2021) (0,32 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>).

A diferença de performance da co-fermentação de vinhaça e glicerol também foi relacionada a maior concentração de biomassa ativa em relação às fermentações de vinhaça e glicerol como mono-substratos. Bernal, de Menezes e Silva (2021) apontaram que a maior concentração de biomassa ativa no EGSB pode ter sido o motivo para maior acidificação da fermentação de vinhaça. Os autores observaram HY máximo de 0,33 mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>, similar aos valores observados no RALF-AT. Por outro lado, Bernal, de Menezes e Silva (2021) deram enfoque à geração de carboxilatos a partir de vinhaça ao observar rendimento de produção de HPr igual a 234 mg HPr g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>. O rendimento de produção de HPr observado por Bernal, de Menezes e Silva (2021) foi superior ao observado no RALF-AT (37 mg HPr g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>). Isto pode ter ocorrido devido novamente ao alongamento de cadeia no RALF-AT, no qual parte do HPr gerado foi alongado à HVa.

No RALF-AT, as concentrações de HPr e HVa aumentaram de 110 para 837 mg L<sup>-1</sup> e de valores não detectáveis para 813 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, ao incrementar a TCO de 90 para 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O aumento da concentração de HPr pode ter ocorrido devido à metabolização de HLa em HPr pela rota do acrilato, à conversão direta de glicose a HPr e à facilidade de metabolização do glicerol a HPr devido aos dois apresentarem o mesmo grau de redução (4,67) (PARANHOS; SILVA, 2020). Em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, as conversões dos carboidratos e HLa presente na vinhaça foram superiores à conversão de glicerol. Então, o glicerol consumido pode ter sido direcionado para crescimento celular e para geração de HPr. O mesmo foi indicado por Lopes, Ramos e Silva (2017) na co-fermentação de soro de queijo e glicerol em reator EGSB. Os autores observaram elevada conversão do carboidrato e glicerol (98%) ao aplicar os cossustratos na mesma proporção (5:5). Porém, o HPr foi o metabólito predominante nas amostras de efluente do reator EGSB, coincidindo com baixos valores de produção de hidrogênio em TDH de 4 h (84 mL H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) (LOPES; RAMOS; SILVA, 2017).

O reator EGSB utilizado por Lopes, Ramos e Silva (2017) apresenta uma tendência de acúmulo de biomassa, o que pode justificar o direcionamento da co-fermentação de soro e



glicerol para geração de HPr. Similarmente, Bernal, de Menezes e Silva (2021) apontaram que o acúmulo de biomassa no reator EGSB pode ter sido o motivo para direcionamento da fermentação de vinhaça para produção de HPr. Então, a maior concentração de biomassa ativa na co-fermentação de vinhaça e glicerol no RALF-AT pode também ter levado ao aumento da geração de HPr. Isto porque em baixos TDHs, como os aplicados por Lopes, Ramos e Silva (2017), Bernal, de Menezes e Silva (2021) e no RALF-AT, as bactérias produtoras de HPr tendem a permanecer no reator enquanto outros organismos com menor capacidade de aderência são lavados (KOSKINEN; KAKSONEN; PUHAKKA, 2007; PARANHOS; SILVA, 2020).

O alongamento de HPr à HVa, por sua vez, pode ter sido facilitado pela temperatura de operação do RALF-AT em TDH de 4 h. Isto porque o aumento da temperatura leva ao aumento da taxa de hidrólise, além de aumentar a velocidade das demais reações (SÁNCHEZ et al., 2021). Então, o HPr prontamente produzido em condição termofílica aliado ao EtOH como doador de elétrons (VERAS et al., 2020) foram alongados à HVa. Nesse sentido, a elevada velocidade de reações em condição termofílica facilita o alongamento de cadeia e menor variabilidade de metabólitos produzidos em relação à condição mesofílica utilizada por Bernal, de Menezes e Silva (2021). É válido mencionar que a maior acidificação do reator mesofílico em relação ao reator termofílico é atestada e atribuída a maior diversidade de microrganismos em condição mesofílica (REGO et al., 2020). Por outro lado, a maior dominância de microrganismos em reatores termofílicos (FERREIRA et al., 2019) pode incorrer em maior rendimento do metabólito de interesse. Bernal, de Menezes e Silva (2021) observaram rendimentos de produção de HBU e HVa iguais a  $62 \text{ mg g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  e  $13 \text{ mg g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ , respectivamente, em TDH de 4 h na fermentação de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de vinhaça. Estes rendimentos foram inferiores aos rendimentos de HBU ( $116 \text{ mg g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) e HVa ( $36 \text{ mg g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) observados na co-fermentação de glicerol e vinhaça no RALF-AT. Ainda, o rendimento de produção de HBU da co-fermentação de vinhaça e glicerol ( $116 \text{ mg g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) foi superior ao da mono-fermentação de vinhaça ( $76 \text{ mg g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) (RAMOS et al., 2021), ambos em TDH de 4 h e RALF termofílico.

### 5.2.3 Composição microbiana no RALF-AT em $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e $55 \text{ }^\circ\text{C}$

A avaliação da composição taxonômica dos microrganismos presentes na biomassa aderida à argila expandida no RALF-AT em condição de maior produção de hidrogênio ( $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) foi realizada por meio de análise metagenômica. Em nível de domínio,

as leituras se encaixaram majoritariamente do Domínio Bacteria (abundância relativa igual a 99,99%). Apenas 0,002% das leituras foram encaixadas no Domínio Archaea e 0,001% em Vírus e no Domínio Eukaryota (Figura 36). Este perfil taxonômico em nível de domínio corrobora a afirmação de que o tratamento térmico + resfriamento eliminaram as arqueias do lodo. Além disso, a manutenção dos valores de pH e TDH em 4,7 e 4 h, respectivamente, foram efetivos na prevenção do reestabelecimento destes microrganismos na operação do RALF-AT em longo termo (478 dias). A baixa abundância relativa de microrganismos pertencentes ao Domínio Archaea também valida a ausência de metano no biogás do RALF-AT.

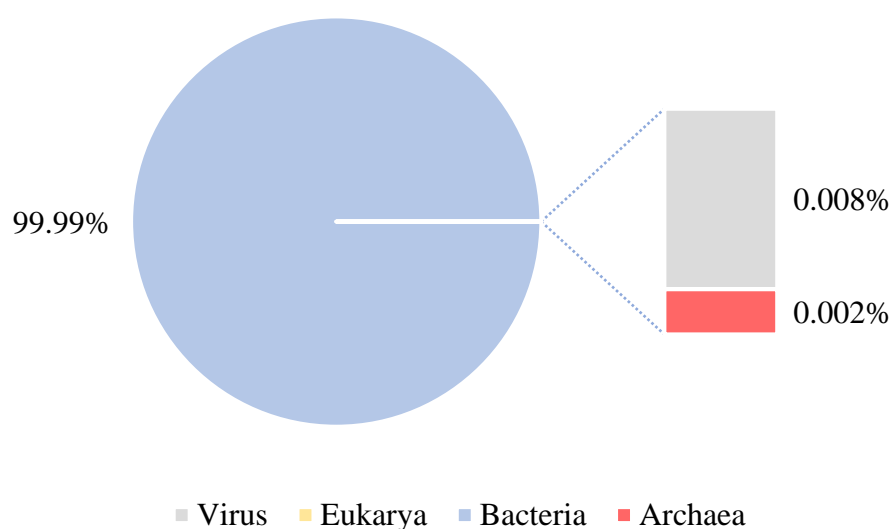


Figura 36. Perfil taxonômico em nível de domínio da biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . As sequências de DNA foram atribuídas aos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya

O filo mais abundante do Domínio Bacteria foi o Firmicutes (99,4%), com nenhum outro filo apresentando abundância relativa superior a 0,5% (Figura 37). De fato, apenas os microrganismos do filo Proteobacteria compuseram 0,05% da biomassa da co-fermentação de vinhaça e glicerol em RALF termofílico. O perfil taxonômico em nível de filo da co-fermentação apresentou tendência diferente da observada na fermentação de glicerol como mono-substrato, i. e., abundância de microrganismos pertencentes ao filo Proteobacteria equivalente à abundância relativa de Firmicutes (SILVA-ILLANES et al., 2017; SILVA et al., 2020b; TOLEDO-ALARCÓN et al., 2020). Por outro lado, enquanto microrganismos pertencentes ao filo Bacterioidetes foram identificados na fermentação mesofílica de vinhaça (WON et al., 2013; REIS et al., 2015), o perfil taxonômico da biomassa na mono-fermentação

termofílica de vinhaça foi bem similar ao observado no RALF-AT (Firmicutes > 99%) (LAZARO et al., 2014; SANTOS et al., 2014a).

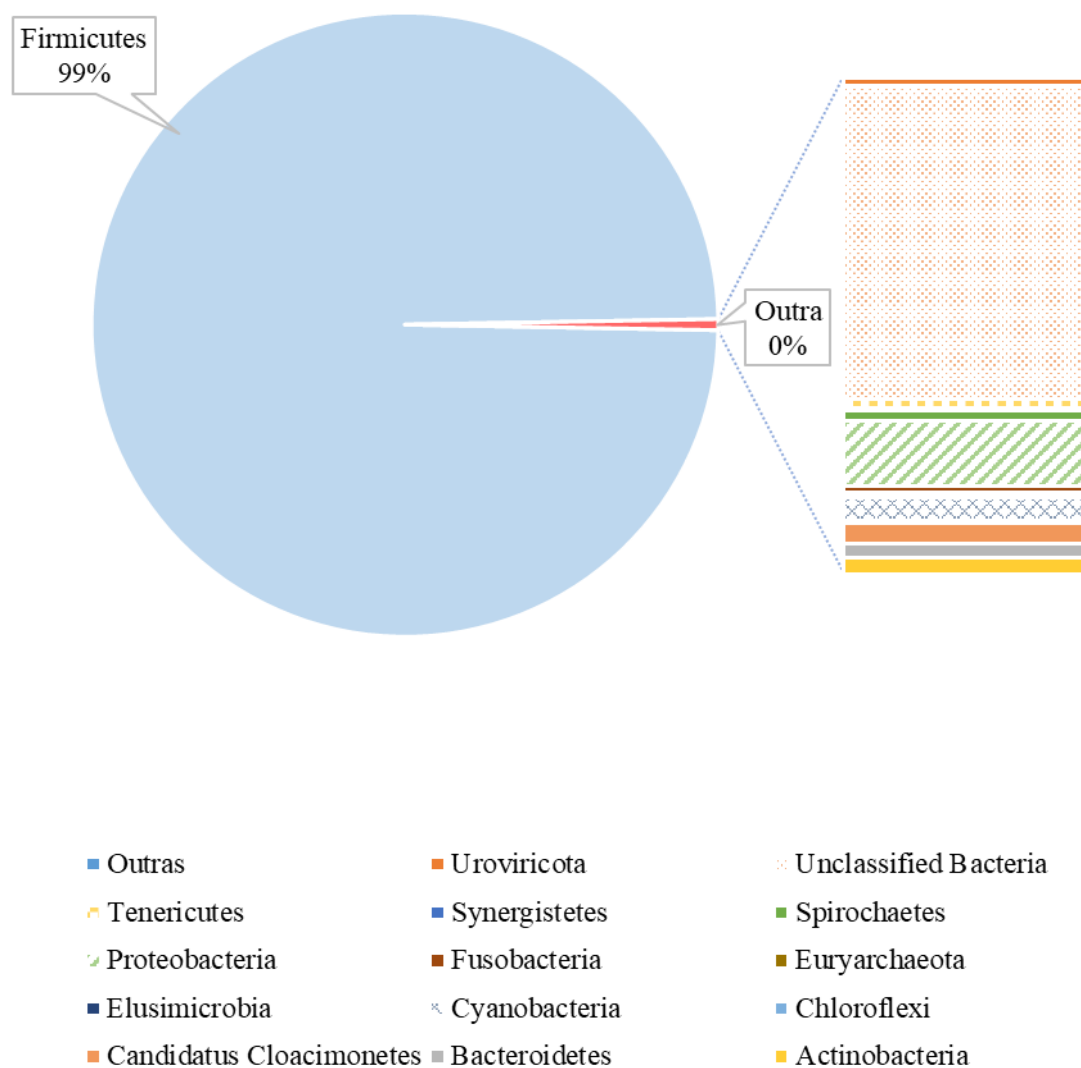


Figura 37. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C

A divisão Firmicutes abrange as bactérias Gram-positivas com membros aeróbios, facultativos e estritamente anaeróbios (SCHLEIFER, 2009). Os microrganismos pertencentes a este filo são associados a possibilidade de metabolização de diversos compostos como carboidratos, proteínas, álcoois e HLa (KHATAMI et al., 2021; VILELA et al., 2021). Então, a elevada abundância relativa de Firmicutes no RALF-AT e na fermentação termofílica de vinhaça (LAZARO et al., 2014; SANTOS et al., 2014a) é justificada pela composição da vinhaça, ou seja, carboidratos, glicerol, nitrogênio e HLa (GODOI et al., 2019). Esta abundância

relativa também pode ser justificada pelo fato deste filo possuir membros termófilos e halófilos que podem ser associados à maior resistência à toxicidade da vinhaça (SCHLEIFER, 2009; CALLEJAS et al., 2021). Adicionalmente, desempenham papel decisivo na hidrólise e acidogênese de compostos complexos presentes no substrato (CALLEJAS et al., 2021) e são relacionados à possibilidade de fermentação em baixos TDHs (SI et al., 2015), como os aplicados no RALF-AT.

O filo Firmicutes contém aproximadamente 223 gêneros pertencentes a ~26 famílias (SCHLEIFER, 2009). Porém, no RALF-AT apenas microrganismos das famílias Clostridiaceae (71%) e Lactobacillaceae (18%) apresentaram abundância relativa superior à 1%. A elevada abundância relativa de Clostridiaceae e Lactobacillaceae no RALF-AT (total de 89%) pode ser associada ao baixo TDH aplicado e à temperatura de operação. Como foi previamente relatado, a manutenção do reator na faixa termofílica pode ter incorrido em baixa diversidade de microrganismos (FERREIRA et al., 2019; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021b). Então, a abordagem utilizada para justificar o desempenho fermentativo do RALF-AT pode ser validada pelo seu perfil taxonômico. Além disso, García-Depraect (2021a) observaram aumento da abundância relativa de *Clostridium* sp. ao reduzir o TDH de 24 h para 6 h e 4 h na fermentação de vinhaça de tequila em CSTR mesofílico (35 °C). Os autores justificaram que a redução do TDH ocasionou redução da abundância relativa de microrganismos não produtores de hidrogênio. Portanto, em vista a redução da variabilidade de metabólitos no RALF-AT a decisão de aplicação de TDH de 4 h foi acertada para co-fermentação de vinhaça e glicerol.

Dentre os membros de Clostridiaceae, 97% foram compostos por microrganismos do gênero *Clostridium*, o que também corresponde a 77% de todas as bactérias identificadas no RALF-AT (Figura 38). Em relação aos membros da família Lactobacillaceae, 56% foram correspondentes ao gênero *Lacticaseibacillus*. Em menor abundância relativa foram observados membros dos gêneros *Lactococcus* (0,19%), *Paenibacillus* (0,20%), *Lactobacillus* (0,20%), *Bacillus* (0,23%), *Ethanoligenens* (0,30%), *Loigolactobacillus* (0,44%) e *Lactiplantibacillus* (1,16%) (Figura 39). A interação entre microrganismos das famílias Lactobacillaceae e Clostridiaceae foi recentemente relatada na literatura como positiva (FUESS et al., 2018; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2019; BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021). Antes da avaliação mais aprofundada da metabolização de HLa, a presença de bactérias produtoras de HLa (*lactic acid bacteria*, LAB) eram encaradas como prejudiciais a fermentação escura devido à inibição de bactérias produtoras de hidrogênio por bacteriocinas (GOMES et al., 2016; ROSA et al., 2016; PACHAPUR et al., 2019).

O carboidrato prontamente disponível na vinhaça pode ser convertido em HLa por LAB (DE MENEZES; SILVA, 2019; FREITAS; DE MENEZES; SILVA, 2020). Então, o HLa presente na vinhaça e o oriundo da fermentação do carboidrato à HLa são convertidos em HBU (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021b). Neste contexto, o efeito deletério da presença de LAB é limitado pela baixa concentração de carboidratos na vinhaça (GARCÍA-BECERRA et al., 2019; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021a), enquanto o HLa é utilizado como substrato por bactérias produtoras de hidrogênio. Por outro lado, a detecção de HLa no efluente acidogênico é indicativo de atividade excessiva de LAB, ou de ausência de microrganismos que metabolizem esse ácido. A caracterização dos microrganismos da fermentação de vinhaça em RALF termofílico no estudo de Santos et al. (2014a) resultou em maior abundância relativa de LAB (86%) em relação a bactérias produtoras de hidrogênio (14%). Isto posto, a concentração de HLa em 20 g DQO L<sup>-1</sup> e 4 h no estudo dos autores foi de 1934 mg L<sup>-1</sup>, enquanto a concentração de HBU foi de 1702 mg L<sup>-1</sup>.

As maiores abundâncias relativas de *Lactobacillus* em relação a *Clostridium* também foram identificadas por Fuess et al. (2020) e Moraes et al. (2019). Fuess et al. (2020) realizaram pré-tratamento térmico no lodo de inóculo previamente a fermentação de vinhaça e observaram que 37% e 21% dos microrganismos corresponderam a *Lactobacillus* e *Clostridium*, respectivamente. Porém, diferentemente de Santos et al. (2014a), Fuess et al. (2020) associaram a geração de HBU à interação entre LAB e *Clostridium* sp.. Esta associação foi atribuída à capacidade de bactérias do gênero *Leuconostoc*, por exemplo, de metabolizar outros compostos a HLa em substituição aos açúcares fermentescíveis que são encontrados em baixas concentrações na vinhaça.

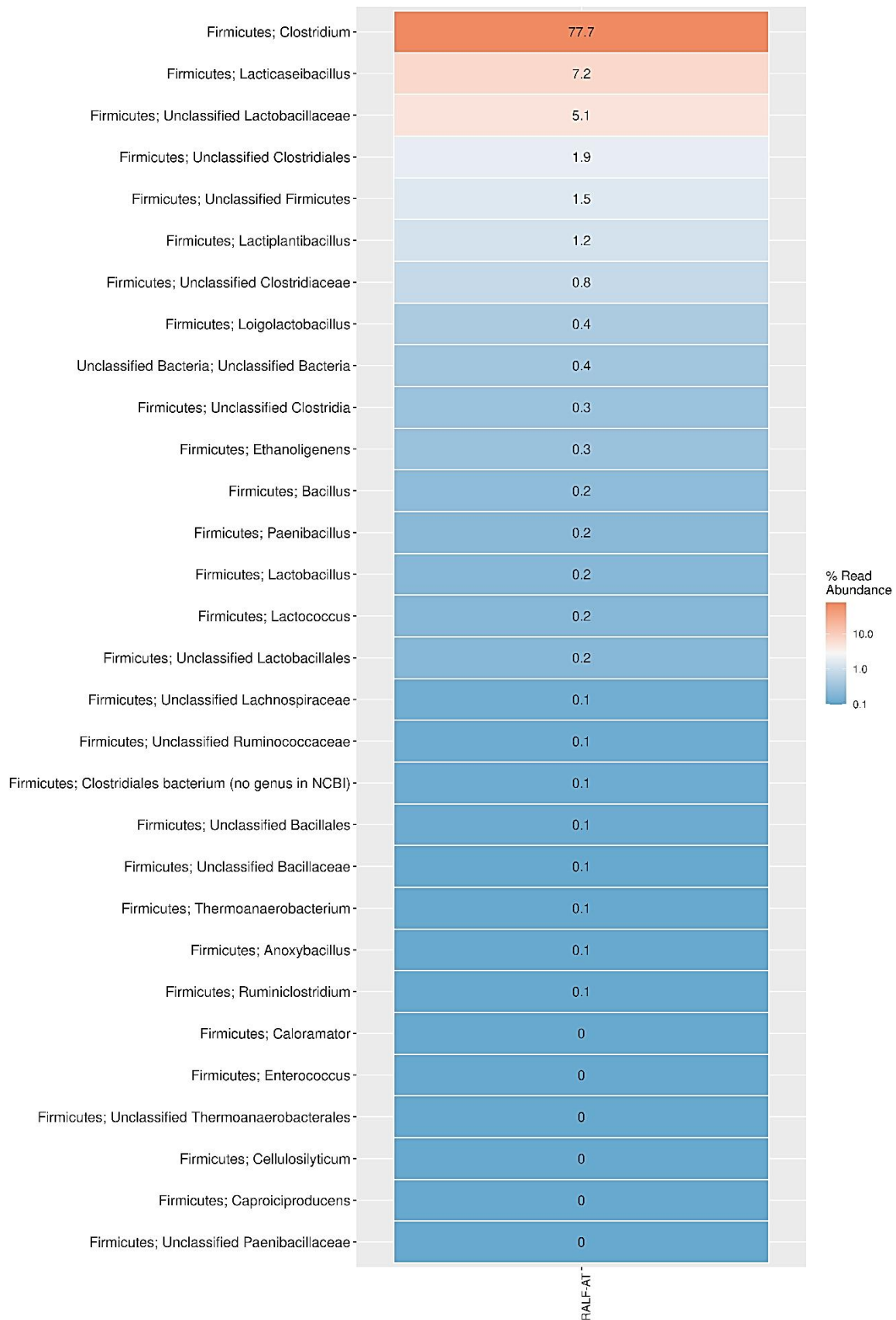


Figura 38. Mapa de calor contendo valores relativos dos Filos; Gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $55 \text{ }^\circ\text{C}$

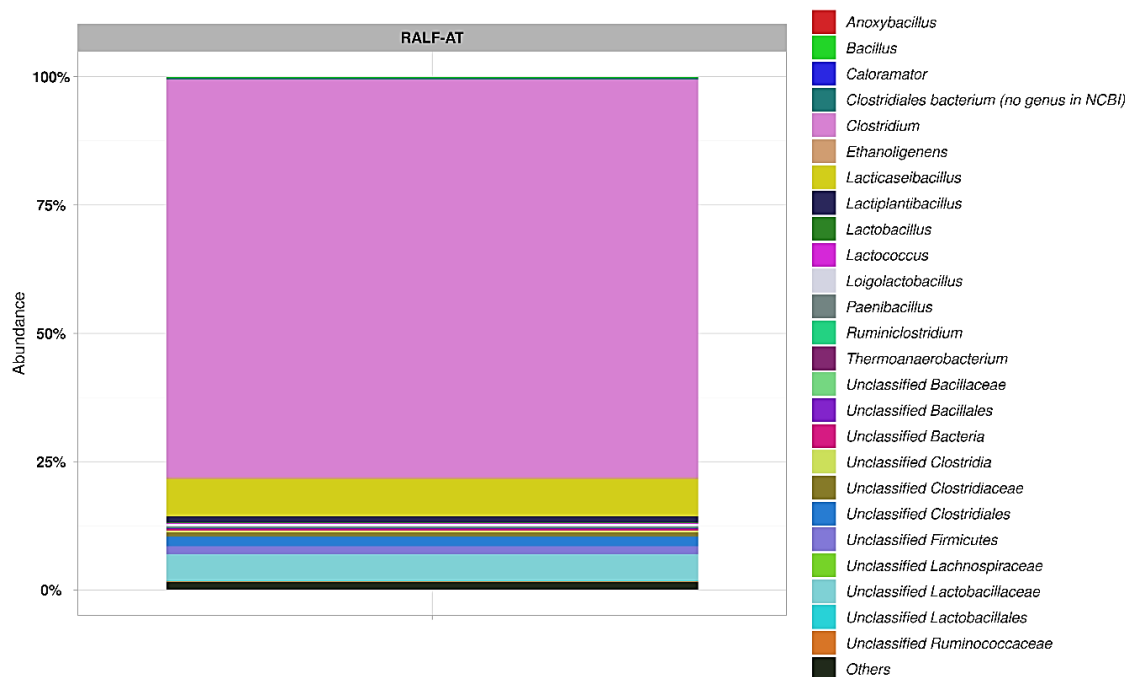


Figura 39. Abundância relativa dos 15 principais gêneros do domínio Bacteria identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-AT em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C

A detecção de *Leuconostoc* foi relatada por Vilela et al. (2021) na fermentação termofílica de melaço. Os autores também atribuíram a presença de microrganismos dos gêneros *Leuconostoc*, *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium* à fermentação de HAc e HLa à HBU. Por sua vez, a associação entre *Thermoanaerobacterium* e *Clostridium* na fermentação de vinhaça foi relatada por Lamaison et al. (2015) em condição termofílica com inóculo termicamente pré-tratado, e por Niz et al. (2019) na fermentação de vinhaça em condições hipertermofílicas. A associação entre microrganismos de gêneros diferentes, porém, realizando a mesma rota na fermentação de vinhaça é considerada redundância funcional (MORAES et al., 2019). Esta redundância funcional é fundamental para manutenção da distribuição de metabólitos na fermentação de vinhaça em condições operacionais variadas. Isto pode explicar a ocorrência de fermentação de HLa e HAc à HBU no RALF-AT, mesmo em abundâncias relativas inferiores à 0,2% de microrganismos dos gêneros *Leuconostoc* e *Thermoanaerobacterium*.

Os microrganismos do gênero *Leuconostoc* são heterofermentativos e, portanto, realizam a conversão de glicose à HLa e EtOH. O rendimento de produção de HLa por microrganismos heterofermentativos é de 1,67 e 1 mol HLa mol<sup>-1</sup> glicose pelas rotas pentose via do fosfato e a fosfocetolase, respectivamente (CUBAS-CANO et al., 2018). Em contrapartida, os microrganismos do gênero *Lacticaseibacillus*, que foram identificados no

RALF-AT, são homofermentativos e apresentam rendimento de produção de HLa igual a 2 mol HLa mol<sup>-1</sup> glicose. Além disso, o rendimento de ATP da fermentação de glicose por microrganismos homofermentativos é superior ao da fermentação por microrganismos heterofermentativos (ZHENG et al., 2020). A predominância de microrganismos do gênero *Lacticaseibacillus* dentre os membros de Lactobacillaceae no RALF-AT é controversa, uma vez que, é reportado que estas bactérias não sobrevivem em temperaturas superiores a 45 °C (ZHENG et al., 2020). Porém, estes microrganismos podem ter sido constantemente inoculados ao RALF-AT devido à sua presença na vinhaça (LAZARO et al., 2014).

A falta de longevidade e a necessidade de inoculação constante de Lactobacillaceae no RALF-AT é uma justificativa plausível para a baixa abundância relativa destes microrganismos em relação às observadas em mono-fermentação de vinhaça por Fuess et al. (2020), Moraes et al. (2019) e Santos et al. (2014a). A baixa longevidade de Lactobacillaceae pode ter sido provocada pela adição de glicerol na fermentação de vinhaça. Isto porque LAB necessitam de fontes de nitrogênio abundantes (CUBAS-CANO et al., 2018). Porém, a adição de glicerol ocasionou aumento da relação DQO/N de 60 para 120. Neste contexto, a adição de glicerol favoreceu a predominância ambos de bactéria homolática, que realiza conversão eficiente de carboidratos em HLa. Ainda a adição de glicerol ocasionou abundância relativa de *Lacticaseibacillus* inferior à de *Clostridium*. Park et al. (2018) utilizaram co-cultura de *Clostridium butyricum* e *Lactobacillus casei* na fermentação de galactose e glicose e relataram que a taxa de utilização de substrato foi superior em *Clostridium* do que em *Lactobacillus*. Além disso, o crescimento celular de *Clostridium* foi superior ao de *Lactobacillus* (PARK et al., 2018). A maior abundância relativa de *Clostridium*, a manutenção de condição termofílica e a adição de glicerol no RALF-AT podem ter levado ao consumo de HLa da vinhaça e do HLa gerado a partir da fermentação de açúcares. Segundo García-Depraect et al. (2021a), a ausência ou baixas concentrações de HLa no efluente da fermentação de vinhaça e a elevada concentração de Hbu é indicativo de fermentação baseada em HLa. Portanto, a adição de glicerol impulsionou a rota já identificada na fermentação deste substrato.

#### 5.2.4 Distribuição das funções metabólicas no RALF-AT

Na Tabela 23 é possível observar a identificação dos genes associados às etapas de degradação da vinhaça e glicerol que foram obtidos por meio da análise metagenômica.



Tabela 23. Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-AT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Hidrólise de sacarose	INV, sacA	beta-fructofuranosidase	EC:3.2.1.26	K01193
Glicólise	glk	glucokinase	EC:2.7.1.2	K00845
	pfkA, PFK	6-phosphofructokinase 1	EC:2.7.1.11	K00850
	GAPDH, gapA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	EC:1.2.1.12	K00134
	PGK, pgk	phosphoglycerate kinase	EC:2.7.2.3	K00927
	PGAM, gpmA	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	K01834
	gpmI	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15633
	PK, pyk	pyruvate kinase	EC:2.7.1.40	K00873
Piruvato	por, nifJ	pyruvate-ferredoxin/ferredoxin oxidoreductase	EC:1.2.7.1	K03737
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	porB	pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit	EC:1.2.7.1	K00170
	DLAT, aceF, pdhC	pyruvate dehydrogenase E2 component	EC:2.3.1.12	K00627
	DLD, lpd, pdhD	dihydrolipoamide dehydrogenase	EC:1.8.1.4	K00382
	E2.3.1.8, pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625
	K15024	putative phosphotransacetylase	EC:2.3.1.8	K15024
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	pct	propionate CoA-transferase	EC:2.8.3.1	K01026
	E1.2.1.10	acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)	EC:1.2.1.10	K00132
ldhA	D-lactate dehydrogenase	EC:1.1.1.28	K03778	

Tabela 23. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-AT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	LDH, ldh	L-lactate dehydrogenase	EC:1.1.1.27	K00016
	mleA, mleS	malolactic enzyme	EC:4.1.1.101	K22212
	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.2	K00002
	E1.1.1.1, adh	alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.1	K00001
	adhP	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	EC:1.1.1.1	K13953
	yiaY	alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.1	K13954
Piruvato	E4.1.1.49, pckA	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	EC:4.1.1.49	K01610
	pps, ppsA	pyruvate, water dikinase	EC:2.7.9.2	K01007
	oadA	oxaloacetate decarboxylase (Na <sup>+</sup> extruding) subunit alpha	EC:7.2.4.2	K01571
	PC, pyc	pyruvate carboxylase	EC:6.4.1.1	K01958
	frdA	fumarate reductase flavoprotein subunit	EC:1.3.5.4	K00244
	mleA, mleS	malolactic enzyme	EC:4.1.1.101	K22212
	pct	propionate CoA-transferase	EC:2.8.3.1	K01026
	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
Propionato	mmsA, iolA, ALDH6A1	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.18 1.2.1.27	K00140
	PCCB, pccB	propionyl-CoA carboxylase beta chain	EC:6.4.1.3 2.1.3.15	K01966
	E5.4.99.2A, mcmA1	methylmalonyl-CoA mutase, N-terminal domain	EC:5.4.99.2	K01848
	E5.4.99.2B, mcmA2	methylmalonyl-CoA mutase, C-terminal domain	EC:5.4.99.2	K01849

Tabela 23. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-AT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Propionato	ACSS1_2, acs	acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	E2.3.1.54, pfID	formate C-acetyltransferase	EC:2.3.1.54	K00656
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	BCKDHA, bkdA1	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component alpha subunit	EC:1.2.4.4	K00166
	DBT, bkdB	2-oxoisovalerate dehydrogenase E2 component	EC:2.3.1.168	K09699
HBu	ACAT, atoB	acetyl-CoA C-acetyltransferase	EC:2.3.1.9	K00626
	croR	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	EC:4.2.1.55	K17865
	paaH, hbd, fadB, mmgB	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.1.1.157	K00074
	paaF, echA	enoyl-CoA hydratase	EC:4.2.1.17	K01692
	fabV, ter	enoyl-[acyl-carrier protein] reductase / trans-2-enoyl-CoA reductase (NAD <sup>+</sup> )	EC:1.3.1.9 1.3.1.44	K00209
	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	ptb	phosphate butyryltransferase	EC:2.3.1.19	K00634
	buk	butyrate kinase	EC:2.7.2.7	K00929
	atoD	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit	EC:2.8.3.8 2.8.3.9	K01034

Tabela 23. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-AT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Glicerol	dhaB	glycerol dehydratase large subunit	EC:4.2.1.30	K06120
	dhaT	1,3-propanediol dehydrogenase	EC:1.1.1.202	K00086
	gldA	glycerol dehydrogenase	EC:1.1.1.6	K00005
	GCY1	glycerol 2-dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.156	K18097
	dhaK	phosphoenolpyruvate---glycerone phosphotransferase subunit DhaK	EC:2.7.1.121	K05878
	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.2	K00002
	glxK, garK	glycerate 2-kinase	EC:2.7.1.165	K00865
Metano	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	E2.3.1.8, pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625
	ACSS1_2, acs	acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
	cdhE, acsC	acetyl-CoA decarboxylase/synthase, complex subunit gamma	CODH/ACS EC:2.1.1.245	K00197
	cdhD, acsD	acetyl-CoA decarboxylase/synthase, complex subunit delta	CODH/ACS EC:2.1.1.245	K00194
	mtaB	methanol---5-hydroxybenzimidazolylcobamide methyltransferase	Co- EC:2.1.1.90	K04480
	fwdE, fmdE	formylmethanofuran dehydrogenase subunit E	EC:1.2.7.12	K11261
	FDH	formate dehydrogenase	EC:1.17.1.9	K00122
	fdoG, fdhF, fdwA	formate dehydrogenase major subunit	EC:1.17.1.9	K00123

Tabela 23. (contin.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol no RALF-AT

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Homoacetogênese	cdhE, acsC	acetyl-CoA decarboxylase/synthase, CODH/ACS complex subunit gamma	EC:2.1.1.245	K00197
	metF, MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)	EC:1.5.1.20	K00297
	acsE	5-methyltetrahydrofolate corrinoid/iron sulfur protein methyltransferase	EC:2.1.1.258	K15023
	acsB	acetyl-CoA synthase	EC:2.3.1.169	K14138
	cooS, acsA	anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase catalytic subunit	EC:1.2.7.4	K00198
	fdhA	formate dehydrogenase (NADP+) alpha subunit	EC:1.17.1.10	K05299
	fhs	formate--tetrahydrofolate ligase	EC:6.3.4.3	K01938
	folD	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	EC:1.5.1.5 3.5.4.9	K01491
Leucina	E2.6.1.42, ilvE	branched-chain amino acid aminotransferase	EC:2.6.1.42	K00826
	BCKDHA, bkdA1	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component alpha subunit	EC:1.2.4.4	K00166
	BCKDHB, bkdA2	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component beta subunit	EC:1.2.4.4	K00167
	DBT, bkdB	2-oxoisovalerate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoyl transacylase)	EC:2.3.1.168	K09699
	DLD, lpd, pdhD	dihydrolipoamide dehydrogenase	EC:1.8.1.4	K00382
Hidrogênio <sup>a</sup>	E1.12.7.2	ferredoxin hydrogenase	EC:1.12.7.2	K00532
	E1.12.7.2L	ferredoxin hydrogenase large subunit	EC:1.12.7.2	K00533
	fdhF	formate dehydrogenase (hydrogenase)	EC:1.17.98.4	K22015

<sup>a</sup>: não associados à nenhuma rota ou metabolismo.

A distribuição das funções metabólicas no RALF-AT foi estudada por meio de pesquisas de ortologias (KO) no KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) *pathway database* (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html#metabolism>). O principal enfoque da análise do perfil funcional do reator foi o nível 1 do KEGG, ou seja, Metabolismo (Tabela 23). Dentre os metabolismos estudados, 62%, 18%, 8% e 6% foram associados à Carboidratos, Energia, Lipídios e Aminoácidos, respectivamente. A predominância de genes associados ao metabolismo de Carboidratos tem relação direta com a hidrólise de sacarose (2% dos KO identificados), a glicólise (13%) e os metabolismos do piruvato (43%), propanoato/propionato (25%) e butanoato/HBu (17%). Isto porque na co-fermentação de vinhaça e glicerol os metabolismos da sacarose e da fermentação de glicerol pela rota oxidativa são conectados em gliceraldeído-3P (YUN et al., 2021). Portanto, a metabolização de cada substratos a partir do piruvato não pode ser analisada separadamente.

Na degradação de glicerol, as enzimas glycerol dehydratase large subunit (K06120, EC:4.2.1.30) e 1,3-propanediol dehydrogenase (K00086, EC:1.1.1.202) catalisam a conversão de glicerol a 3-hidroxi-propionaldeído e posteriormente a 1,3-PDO. Porém, genes relacionados a enzima glycerol dehydratase lage subunit não foram identificados na amostra de biomassa extraída do RALF-AT em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Figura 40). Então, apesar do potencial metabólico para conversão 3-hidroxi-propionaldeído em 1,3-PDO, a ausência de 1,3-PDO nas amostras de efluente desse reator nesta TCO é justificada. Por outro lado, os genes relacionados a desidrogenação de glicerol em di-hidroxiacetona (glicerona) foram identificados na amostra e associados ao metabolismo de microrganismos do gênero *Clostridium*. É válido mencionar que os genes de quinase de di-hidroxiacetona em fosfato de di-hidroxiacetona, identificados no RALF-AT, também podem ser observados na metabolização de frutose. Entretanto, o gene triose-fosfato isomerase (K01803, EC 5.3.1.1), responsável pela conversão de di-hidroxiacetona em gliceraldeído-3P na metabolização de frutose (MAZARELI et al., 2020), não foi identificado na amostra do RALF-AT. Portanto, as enzimas associadas ao metabolismo do glicerol pela via oxidativa são provavelmente exclusivas do metabolismo de lipídios.

KO associadas à degradação de aminoácidos também foram identificadas nas amostras do RALF-AT. As enzimas amino acid aminotransferase de cadeia ramificada (K00826, EC:2.6.1.42), 2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component (K00166/K00167, EC:1.2.4.4), 2-oxoisovalerate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoyl transacylase) (K09699, EC:1.8.1.4) e dihydrolipoamide dehydrogenase (K00382, EC:1.8.1.4) podem ser relacionadas a ambas as degradações de valina, leucina e isoleucina. Não foram realizadas análises para detecção de leucina, valina e isoleucina nas amostras líquidas de alimentação do RALF-AT,

porém, Parsaee, Kiani e Karimi (2019) apontaram que esses aminoácidos são comuns na composição de vinhaça. Neste caso, estes aminoácidos podem ter desempenhado papel na detecção de HVA na co-fermentação de vinhaça e glicerol (reação de Stickland a partir de leucina e glicina (MEEGODA et al., 2018)). Isto demonstra o papel da heterogeneidade da composição da vinhaça nos processos fermentativos.

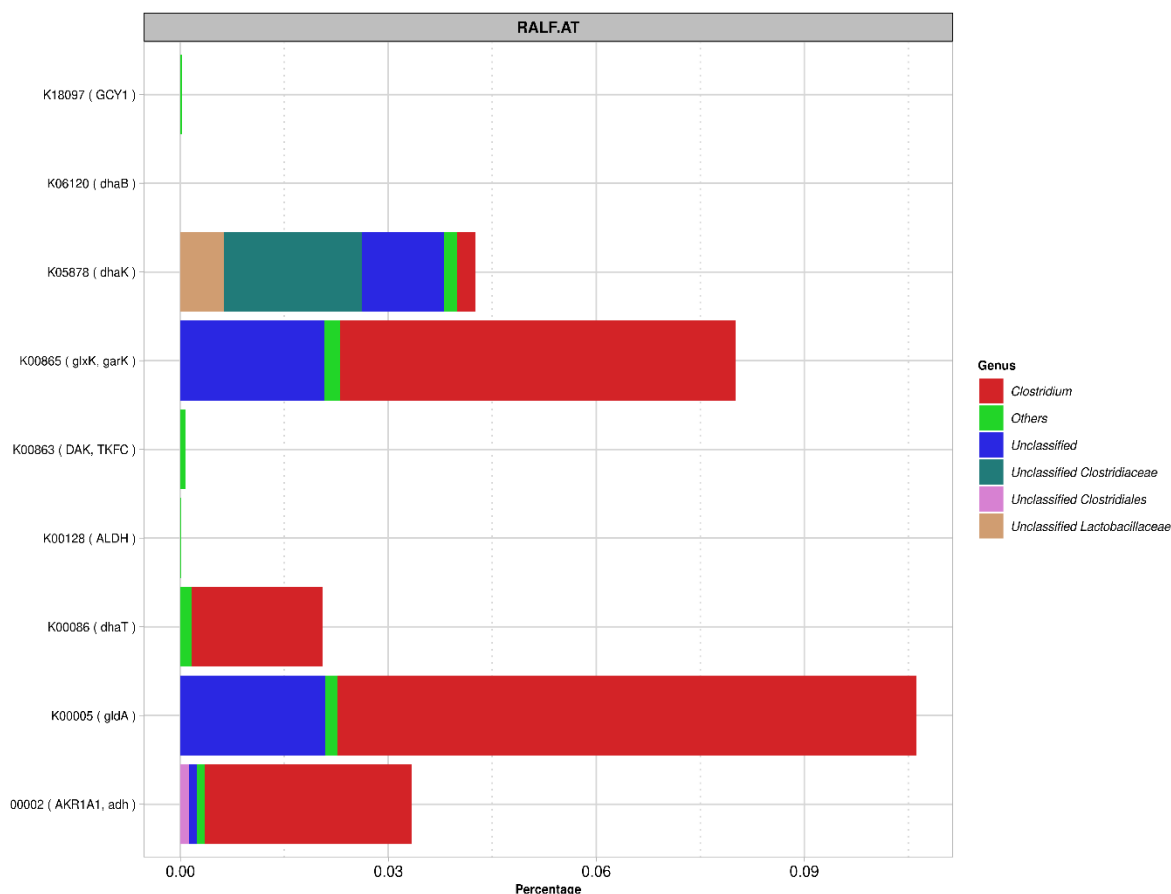


Figura 40. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de glicerol no RALF-AT

Uma outra evidência da importância da heterogeneidade da composição da vinhaça está relacionada à conversão do HLa ( $443 \text{ mg DQO L}^{-1}$ ) presente nesse substrato. Além do HLa presente da vinhaça, foi apontada a hipótese de produção de HLa a partir do carboidrato/glicerol presente na vinhaça por microrganismos dos gêneros *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus* e *Loigolactobacillus* identificados na biomassa do RALF-AT. De fato, as enzimas D-lactate dehydrogenase (K03778, EC:1.1.1.28), L-lactate dehydrogenase (K00016, EC:1.1.1.27) e malolactic enzyme (K22212, EC:4.1.1.101) são associadas aos metabolismos de *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Loigolactobacillus* e *Clostridium*, e foram identificados

na amostra do RALF-AT (Figura 41). D-lactate dehydrogenase e L-lactate dehydrogenase podem desempenhar os papéis de conversão de piruvato à D-Lactato e L-Lactato, respectivamente. Em contrapartida, a malolactic enzyme pode catalisar a conversão de acetyl-Coa em L-Lactato, e de ácido málico em L-Lactato. A conversão de ácido málico em L-Lactato foi provavelmente possibilitada pelas conversões de fosfoenolpiruvato e piruvato à oxaloacetato e de oxaloacetato à malato. Neste último caso, os genes podem ser associados a *Lactocaseibacillus* e *Clostridium*. Então, estes resultados estão em acordo com a classificação taxonômica dos microrganismos do RALF-AT.

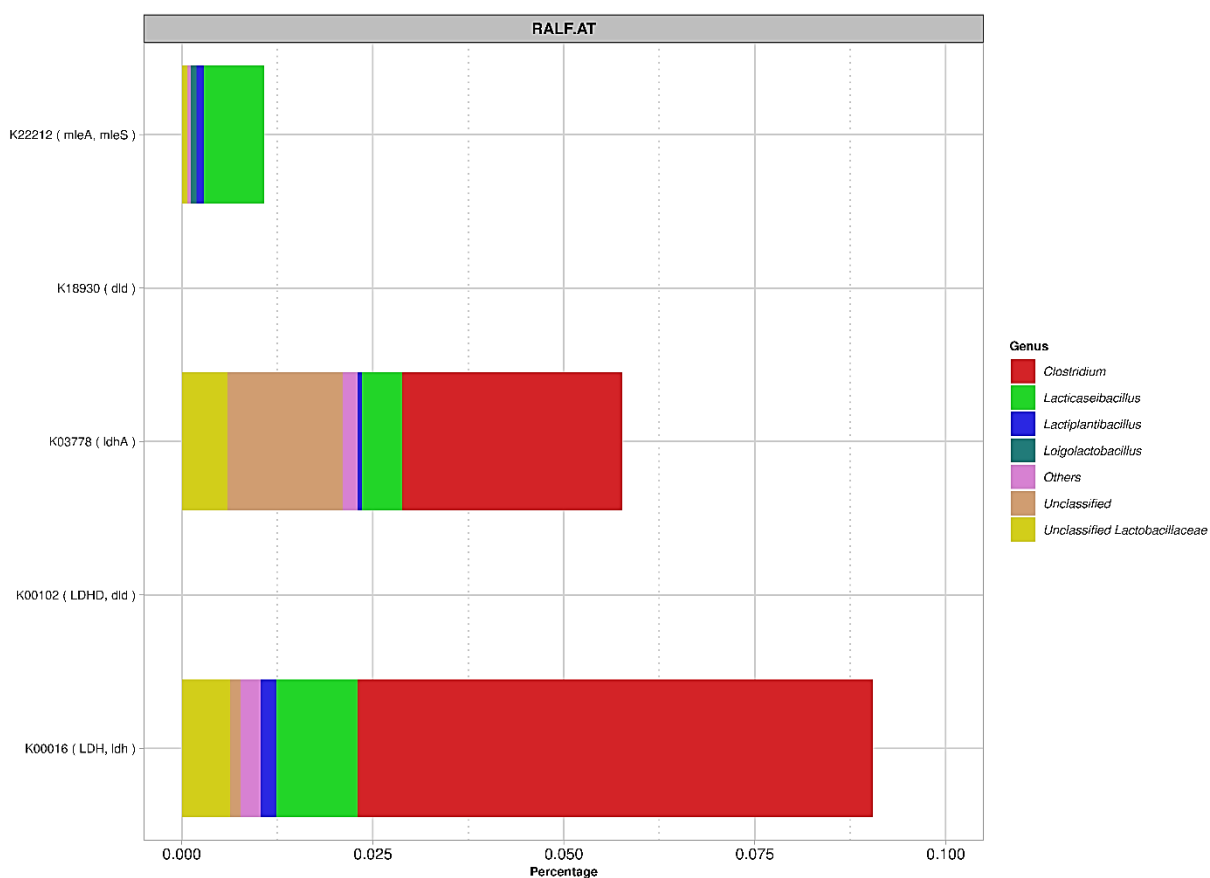


Figura 41. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na síntese de L e D-Lactato (metabolismo do piruvato) no RALF-AT

O HLa alimentado e o produzido no RALF-AT pode ter desempenhado papel na formação dos dois principais produtos metabólicos da co-fermentação de vinhaça e glicerol: HBU (fração molar igual a 54%) e HPr (20%). Infelizmente, a utilização de HLa para geração de HBU e de HPr são rotas divergentes de utilização do substrato (CAVALCANTE et al., 2017). Dentre as enzimas relacionadas ao metabolismo do propanoato, as associadas aos genes



propionate CoA-transferase (K01026, EC:2.8.3.1) e butyryl-CoA dehydrogenase (K00248, EC:1.3.8.1) foram identificadas no RALF-AT. Essas enzimas apresentam potencial metabólico para desidrogenação de HLa à HPr pela rota do acrilato. Esta rota é comumente associada a *Megasphaera elsdenii* (VERAS et al., 2020), não identificada no RALF-AT. Por outro lado, dentre os microrganismos atribuídos aos genes detectados nas amostras do RALF-AT (Figura 42), os do gênero *Clostridium* foram identificados em maior abundância relativa. Essa rota foi previamente identificada em *Clostridium neopropionicum*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium viride*, e *Clostridium homopropionicum*, que utilizam HLa como substrato e fonte de carbono para crescimento celular (SCHLEIFER, 2009).

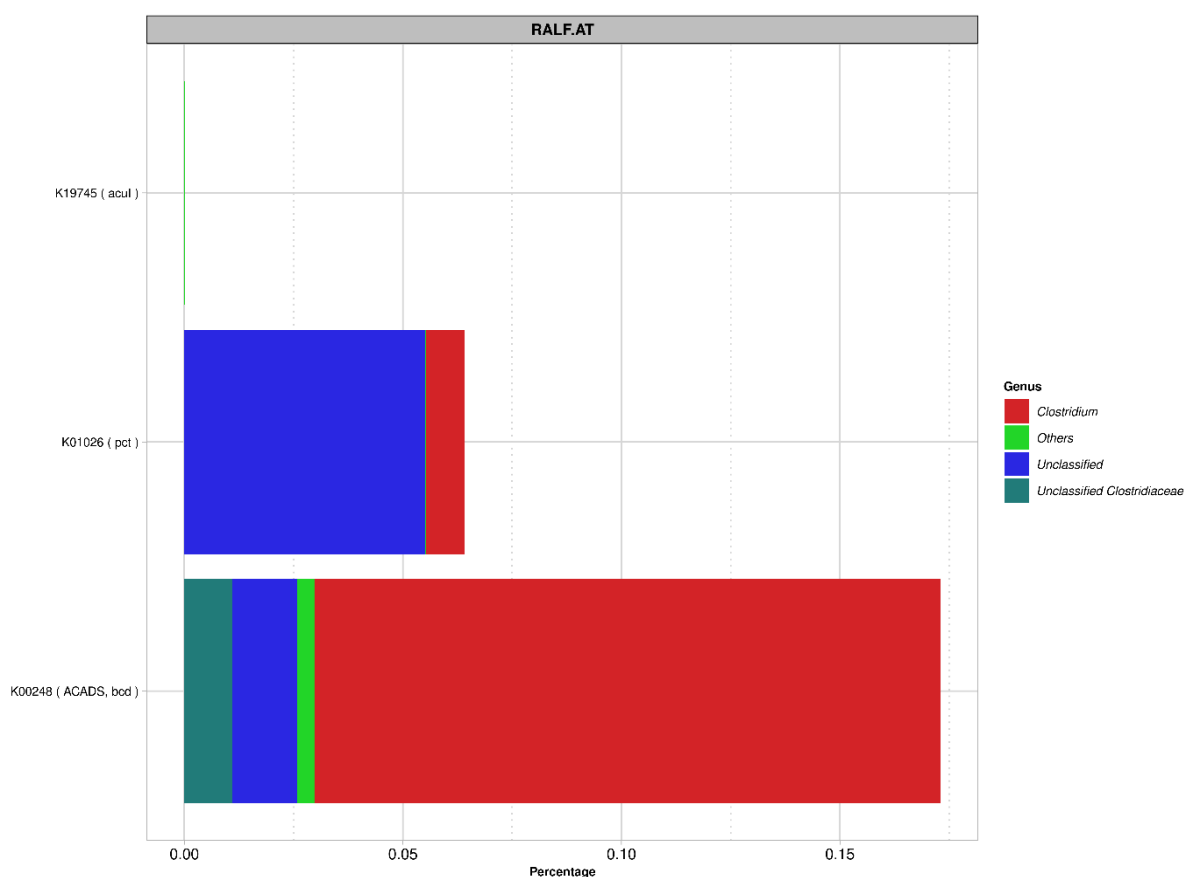


Figura 42. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na síntese de propanoato na metabolização de lactato no RALF-AT

A conversão de malato à HLa foi previamente justificada pela provável atividade da malolactic enzyme identificada na amostra. A hipótese é que o malato, não detectado nas amostras líquidas do RALF-AT, foram obtidos pelo meio da conversão de fosfoenolpiruvato e piruvato à oxaloacetato. Por outro lado, o malato também pode ter sido hidratado à fumarato e

posteriormente a succinato. Neste último caso, o succinato pode ter entrado na síntese de propanoato por meio do ciclo Wood-Werkman, em que os succinil-CoA e metilmalonil-CoA são intermediários (FALENTIN et al., 2010). O ciclo Wood-Werkman foi previamente proposto para justificar a síntese de HPr na fermentação de vinhaça em RALF (REGO et al., 2020). Contudo, a principal característica deste ciclo, que foi extensivamente estudado em *Propionibacterium freudenreichii*, é a transcarboxilação sem o envolvimento de CO<sub>2</sub> livre catalisada pela enzima metilmalonil-CoA carboxitransferase (K03416, EC:2.1.3.1). Esta enzima não foi identificada na amostra do RALF-AT, assim como microrganismos do filo Actinobacteria. Em contrapartida, foi identificado potencial metabólico do gene *mmsA*, *iolA*, *ALDH6A1* que encodifica a enzima methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (K00140, EC:1.2.1.18 1.2.1.27). Esta enzima catalisa a conversão de semialdeído de metil-malonato à propanoil-CoA.

A enzima methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase foi associada no reator a microrganismos pertencentes a Lactobacillaceae. Nesse caso, essa enzima pode ter desempenhado duplo papel: na conversão de semialdeído de metil-malonato à propanoil-CoA e na conversão de semialdeído de malonato a acetil-CoA. Neste último cenário, o acetil-CoA pode ter sido empregado na via de síntese de HBU. Os genes que codificam enzimas de síntese de HBU foram abundantes no RALF-AT. Inclusive, microrganismos do gênero *Lactocaseibacillus* foram atribuídos à conversão de acetil-CoA em acetoacetil-CoA (K00626, EC:2.3.1.9). O HBU, por sua vez, pode ter sido formado pela conversão direta de butanoil-CoA (K01034, EC:2.8.3.8 2.8.3.9), ou pela conversão de butanoil-CoA em fosfato de butanoil (K00634, EC:2.3.1.19), e este último em butanoil-CoA. A abundância de genes que codificam enzimas de síntese de HBU e a elevada concentração desse metabólito no efluente do RALF-AT (2620 mg L<sup>-1</sup>) podem comprovar a hipótese previamente formada de produção de hidrogênio a partir dessa rota. No entanto, a atividade do gene *buk* pode ser associada tanto a conversão direta de carboidratos a HBU quanto a conversão indireta de HLa a HBU. Esta última via é reconhecida a partir da detecção adicional dos genes *ldhA*, *LDH*, *ldh*, que foram de fato identificados no RALF-AT.

As rotas que podem ter sido seguidas no RALF-AT e os microrganismos associados a essas rotas estão sintetizadas na Figura 43. Em suma, a identificação de LAB e de genes que codificam enzimas que catalisam a conversão de acetil-CoA e piruvato à L-Lactato e D-Lactato levaram a crer que parte do carboidrato afluente ao RALF-AT foi convertido em HLa. Adicionalmente, o HLa formado e o HLa afluente ao reator (presente na vinhaça) foram provavelmente utilizados nas vias metabólicas de produção de HPr e HBU. Estas hipóteses

podem ser validadas pela identificação de genes associados as rotas do acrilato e de síntese de HBU. Neste contexto, a co-fermentação de vinhaça e glicerol em  $120 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  seguiu a mesma tendência da fermentação de vinhaça como mono-substrato, i. e., de síntese de HBU como metabólito majoritário na fase líquida e liberação de hidrogênio na fase gasosa.

A maior diferença entre a mono-fermentação de vinhaça e a co-fermentação de vinhaça com glicerol é que nesta última os valores de HY foram reduzidos. A maior hipótese levantada para menor HY na co-fermentação com base na análise dos parâmetros biocinéticos foi de maior acúmulo de biomassa no RALF-AT. Este acúmulo, por sua vez, pode ter sido proporcionado pela utilização do glicerol no crescimento celular. Ao passo que o acúmulo de biomassa leva à redução do HY, leva também à maior robustez do sistema. Isto porque o maior acúmulo de biomassa permite aplicação de TCOs mais elevadas (BERNAL; DE MENEZES; SILVA, 2021). Esta hipótese pode ser validada ambos pelo comportamento do RALF-AT, ou seja, maior conversão de carboidratos em relação à mono-fermentação de vinhaça (veja item 5.2.1), quanto pela presença de genes que codificam enzimas da via Wood- Ljungdahl (Tabela 23). Isto porque Bernal, de Menezes e Silva (2021) apresentaram relação direta entre o acúmulo de biomassa no reator e a ocorrência de homoacetogênese.

Na via Wood-Ljungdahl (homoacetogênese) os 8 NADH gerados por meio da glicólise e da metabolização do piruvato são oxidados pela redução de 2 mol de  $\text{CO}_2$  para formar o terceiro mol de acetato (DE MENEZES; SILVA, 2019). A ocorrência de homoacetogênese se mostrou independente do TDH aplicado (DE MENEZES; SILVA, 2019; FREITAS; DE MENEZES; SILVA, 2020). Além disso, a produção de acetato por meio da homoacetogênese foi reduzida pela utilização do RALF como configuração de reator (REGO et al., 2020; CAROSIA et al., 2021). Essa redução foi potencializada pela fermentação em condição termofílica (REGO et al., 2020). Outro fator que se mostrou favorável ao controle da homoacetogênese foi o aumento da relação carbono/nitrogênio (CAROSIA et al., 2021). Nesse sentido, a ocorrência de homoacetogênese no RALF-AT parece improvável devido à utilização de RALF termofílico com aumento da relação carbono/nitrogênio pela inserção de glicerol (aumento de carbono). Contudo, Carosia et al. (2021) apontaram que a via Wood-Ljungdahl pode ser provocada pela escassez de substrato devido à elevada concentração de biomassa no reator. Portanto, além do maior potencial metabólico de *Clostridium* para ocorrência de homoacetogênese (MONTROYA et al., 2020), gênero majoritário no RALF-AT, a formação de acetato por essa via pode explicar os baixos valores de HY na co-fermentação de glicerol e vinhaça.

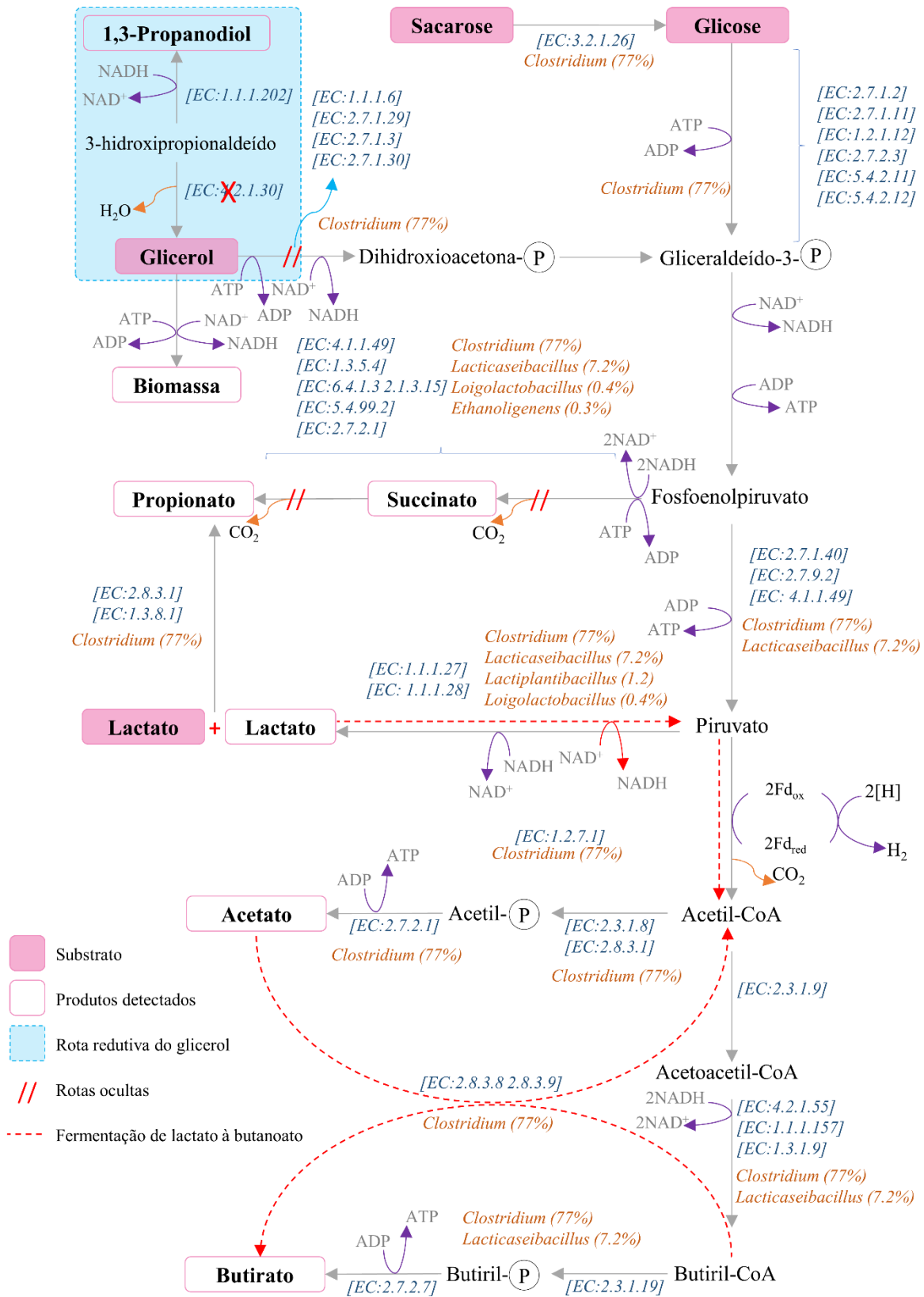


Figura 43. Possíveis vias para a fermentação de glicerol, carboidratos e lactato no RALF-AT. Os números entre chaves representam os EC (Números da Comissão de Enzimas) para os principais KO identificados e os valores em parêntesis são as abundâncias relativas dos principais gêneros identificados na amostra de 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>

### 5.3 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM DOIS ESTÁGIOS: RALF-ST E RALF-SM

Nessa seção são apresentados os resultados do efeito do aumento da TCO de 2 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> na performance da digestão anaeróbia em RALFs termofílico (55°C) e mesofílico (25°C) alimentados com efluente de RALF acidogênico termofílico (55 °C) utilizado na fermentação de vinhaça e glicerina em proporção 50%: 50% (base DQO).

#### 5.3.1 Remoção de matéria orgânica e produção de metano no RALF-ST

O RALF-ST foi inicialmente mantido à 55 °C com TDH fixo em 24 horas. A alimentação do RALF-ST na primeira etapa de operação (2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) consistiu em vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO). Na etapa seguinte (5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>), a alimentação composta por vinhaça e glicerina foi substituída por efluente do RALF-AT (10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) diluído. A mesma diluição do efluente do RALF-AT (10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) foi realizada para alimentação do RALF-ST em 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Nas etapas de 10, 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> o efluente do RALF-AT foi aplicado sem diluição na alimentação do RALF-ST.

##### 5.3.1.1 Efeito do aumento da TCO no desempenho do RALF-ST

As concentrações de carboidratos totais, glicerina e matéria orgânica afluentes e efluentes ao RALF-ST são apresentadas na Tabela 24, enquanto os resultados de remoção destes constituintes estão expostos na Figura 44.

Tabela 24. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais, glicerina e DQO em função da TCO aplicada ao RALF-ST

<b>Etapa</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>afllu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>eflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glic<sub>afllu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glic<sub>eflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DQO<sub>afllu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>DQO<sub>eflu</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
1	2	122 ± 51	39 ± 17	889 ± 103	47 ± 5	2110 ± 259	272 ± 33
2	5	177 ± 64	41 ± 15	1210 ± 299	51 ± 13	4868 ± 511	411 ± 42
3	7,5	319 ± 85	75 ± 20	2335 ± 892	51 ± 20	7990 ± 569	871 ± 62
4	10	325 ± 117	110 ± 40	2719 ± 905	82 ± 28	10553 ± 1274	1889 ± 228
5	15	836 ± 263	185 ± 56	7103 ± 1076	137 ± 85	15411 ± 2569	2140 ± 754
6	20	902 ± 289	193 ± 66	9026 ± 1674	93 ± 16	21145 ± 2475	4367 ± 1123

TCO: taxa de carregamento orgânico; C<sub>afllu/eflu</sub>: concentração de carboidratos afluente/efluente; Glic<sub>afllu/eflu</sub>: concentração de glicerol afluente/efluente; DQO<sub>afllu/eflu</sub>: demanda química de oxigênio afluente/efluente.

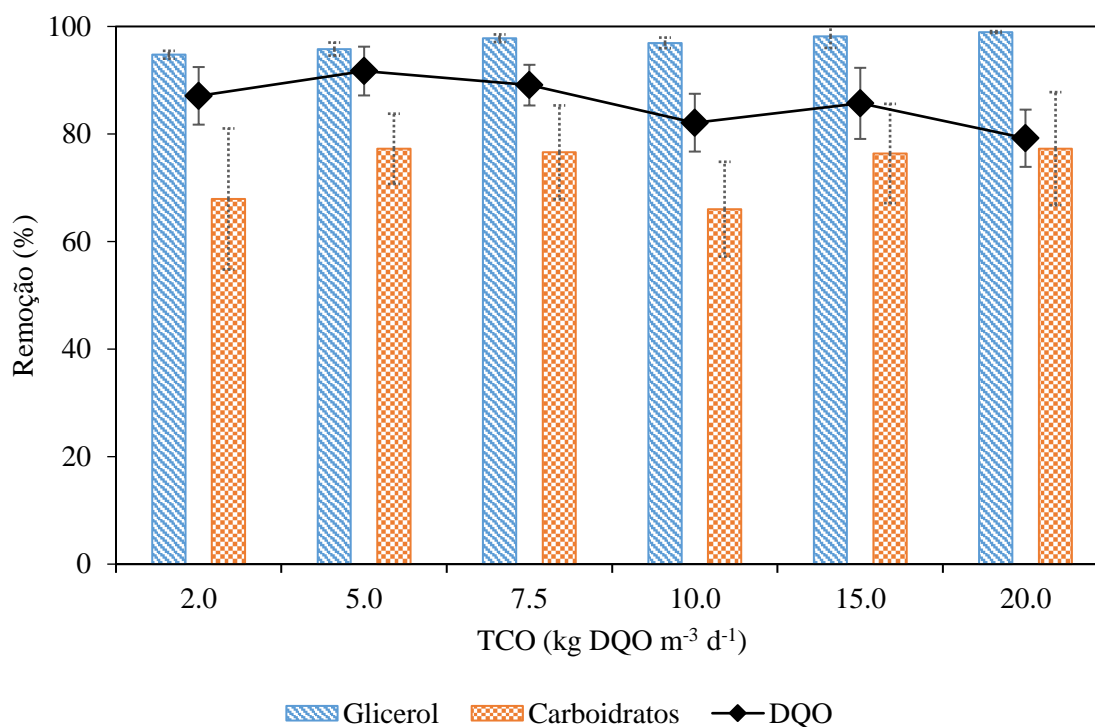


Figura 44. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-ST

As eficiências de remoção de glicerol no RALF-ST foram elevadas (> 97%), assim como no RALF-MT, e podem ser associadas à elevada biodegradabilidade do glicerol e à dose de glicerol aplicada. O glicerol entra nas células por transporte passivo sem necessidade de hidrólise e é prontamente acidificado por microrganismos acidogênicos (MEIER et al., 2020b). Em muitos casos, essa acidificação leva ao acúmulo de ácidos orgânicos e é reportada como prejudicial à atividade do consórcio metanogênico (CHOU; SU, 2019). Em contrapartida, a acidificação e o efeito deletério da adição de glicerol como cossustrato estão associadas a dose de glicerol e à carga orgânica aplicadas (ZAHEDI et al., 2018). No caso do RALF-MT, as doses de glicerol aplicadas ao inserir proporção fixa de 50% vinhaça: 50% glicerina em base DQO foi de 0,3% a 0,8% v v<sup>-1</sup>, ou seja, inferiores as doses de glicerina reportadas por efeito deletério à co-digestão (> 1% v v<sup>-1</sup>) (FOUNTOULAKIS; MANIOS, 2009; SILVA et al., 2018; RASIT et al., 2019; ZHANG et al., 2020b). Por consequência, as doses de glicerina adicionadas ao RALF-ST foram ainda menores do que as adicionadas ao RALF-MT, uma vez que, foram observadas eficiências de remoção de glicerina iguais a 54,3%, 38,3% e 15,1% em TCOs de 10, 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, no RALF-AT.

Os valores médios de eficiência de remoção de carboidratos totais no RALF-ST permaneceram estáveis entre 66,0% e 77,3% e, com exceção da TCO de 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>,

foram inferiores aos observados no RALF-MT. A diferença entre as performances do RALF-ST e RALF-MT na eficiência de remoção de carboidratos totais pode estar atrelada à baixa concentração de carboidratos na vinhaça. Enquanto os carboidratos degradáveis são inteiramente removidos no RALF-MT, no processo em dois estágios estes são convertidos previamente no RALF-AT, restando apenas carboidratos de difícil degradação para remoção no RALF-ST. Porém, em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  os RALF-MT e RALF-AT foram alimentados com lote de vinhaça de relação DQO/carboidratos totais 2-vezes superior aos lotes utilizados nas demais condições operacionais. Neste caso, a maior adaptabilidade do RALF-ST à alimentação de carboidratos de difícil degradação levou à maior eficiência de remoção de carboidratos quando comparado ao RALF-MT em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

Assim como foi observado na maioria das condições operacionais aplicadas aos RALF-ST e RALF-MT, Xiao et al. (2018) observaram remoções de carboidrato (94,7% e 95,7%) e matéria orgânica (80,74% e 81,45%) similares ao compararem a digestão anaeróbia termofílica de resíduos alimentares em um estágio e dois estágios. A redução da eficiência de remoção de carboidratos totais em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  também foi observada para eficiência de matéria orgânica, que caiu de 92,4% em  $7,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para 75,5% em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no RALF-MT. Porém, no RALF-ST a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 82,1% em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Isto demonstra que a adição de um reator acidogênico previamente a um reator metanogênico pode reduzir os impactos causados pela variação da qualidade do afluente. O aumento da TCO de 10 para  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e regularização do lote de vinhaça aplicado (Tabela 9) levou ao acréscimo da eficiência de remoção de matéria orgânica de 82,1% para 85,7% no RALF-ST e de 75,5% para 85,9% no RALF-MT.

Apesar da performance de remoção de matéria orgânica dos RALF-ST e RALF-MT terem sido similares na maioria das condições operacionais, a performance global do RALF-AT + RALF-ST foi de 3% a 5% superior à do RALF-MT de 10 a  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Ferraz Júnior et al. (2016) compararam a produção de hidrogênio e metano a partir de vinhaça em dois estágios em APBR (55 °C) seguido de reator UASB (55 °C) com a produção de metano em estágio único em reator UASB (55 °C). Os autores observaram que para a TCO entre 15 e  $25 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a remoção de DQO total no reator UASB do sistema em dois estágios foi de 63% e a remoção de DQO total no sistema em estágio único foi de 60,7%. Entretanto, ao observar a remoção de DQO total do APBR + UASB de 74,6% os autores consideraram que a performance do sistema em dois estágios foi superior à do reator UASB em estágio único. Considerando os resultados do estudo de Ferraz Júnior et al. (2016), no quesito remoção de



matéria orgânica, as eficiências globais de remoção do RALF-AT + RALF-ST não foram significativamente superiores às do RALF-MT.

Na Tabela 25 estão apresentadas as concentrações de AGV e as relações AI/AP do efluente do RALF-ST em função das TCO aplicadas. Os valores de pH afluente e efluente do RALF-ST permaneceram em  $6,2 \pm 0,5$  e  $8,1 \pm 0,4$ , respectivamente. Para tanto, foi adicionado  $0,10 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$  ao efluente do reator acidogênico previamente à alimentação do RALF-ST. A relação AI/AP permaneceu entre  $0,30 \pm 0,10$  e  $0,46 \pm 0,12$ , mesmo com o aumento da concentração de efluente do RALF-AT aplicada ao RALF-ST, indicando ausência de instabilidade em TCOs elevadas. Foi observado aumento da concentração de AGV de  $94 \text{ mg HAc L}^{-1}$  em  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para  $208 \text{ mg HAc L}^{-1}$  ao aplicar efluente do reator acidogênico em concentração igual a  $7,5 \text{ g DQO L}^{-1}$ . Contudo, ao aumentar a TCO de  $7,5$  para  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi observado acréscimo acentuado da concentração de AGV para  $1173 \text{ mg HAc L}^{-1}$ .

Tabela 25. Valores médios de AGV e relação AI/AP nas amostras de efluente do RALF-ST

Etapa	TCO ( $\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ )	AGV <sub>efluente</sub> ( $\text{mg HAc L}^{-1}$ )	AI/AP <sub>efluente</sub>
1	2	$94 \pm 61$	$0,42 \pm 0,16$
2	5	$122 \pm 70$	$0,36 \pm 0,14$
3	7,5	$208 \pm 59$	$0,30 \pm 0,10$
4	10	$1173 \pm 136$	$0,46 \pm 0,12$
5	15	$1328 \pm 451$	$0,44 \pm 0,17$
6	20	$682 \pm 190$	$0,42 \pm 0,04$

AGV<sub>eflu.</sub>: ácidos graxos voláteis efluente; AI: alcalinidade intermediária; AP: alcalinidade parcial.

O aumento acentuado na concentração de AGV ocorreu simultaneamente à aplicação de efluente acidogênico sem diluição no RALF-ST. O efluente do RALF-AT foi composto por  $130 \text{ mg L}^{-1}$  de HLa,  $229 \text{ mg L}^{-1}$  de HPr,  $260 \text{ mg L}^{-1}$  de HAc,  $67 \text{ mg L}^{-1}$  de EtOH,  $379 \text{ mg L}^{-1}$  de HBU e  $1559 \text{ mg L}^{-1}$  de 1,3-PDO em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Contudo, por meio de análise de cromatografia gasosa foi detectado apenas HAc ( $57 \text{ mg L}^{-1}$ ) no efluente do RALF-ST nesta condição operacional. A detecção de HAc no efluente do RALF-ST indica que todos os AGV

e álcoois adicionados a esse reator por meio do efluente acidogênico foram oxidados à acetato. Atenção especial deve ser dada ao HPr e ao 1,3-PDO, uma vez que, a degradação do 1,3-PDO a metano em um reator em segundo estágio pode ser dificultada. Essa hipótese é confirmada por relatos da adição de arqueia (*Methanosarcina mazei*) no estímulo da conversão de ácidos orgânicos no fermentado com o propósito de aumentar a fração molar de 1,3-PDO no meio líquido (SUN et al., 2018).

Lymperatou, V. Skiadas e N. Gavala (2018) relataram que a baixa taxa de consumo de 1,3-PDO pode ser etapa limitante na produção de metano em co-digestão de dejetos de suínos e glicerol. Silva et al. (2018) realizaram a co-digestão mesofílica (35 °C) de resíduos alimentares, lodo de esgoto e glicerol em dois estágios e indicaram que a síntese de 1,3-PDO em na etapa acidogênica pode prejudicar a digestão em etapa metanogênica devido à conversão de 1,3-PDO em HPr. Por outro lado, a redução de sulfato pode ter auxiliado na degradação do 1,3-PDO afluente no RALF-ST. Isso pode ter ocorrido porque a degradação anaeróbia de 1,3-PDO a acetato requer a redução de aceptores de elétrons como o sulfato (OPPENBERG; SCHINK, 1990). De fato, o sulfato afluente ao RALF-ST em todas as condições operacionais foi removido, i. e., 37, 86, 142, 1227, 458, 643 mg L<sup>-1</sup> em 2; 5; 7,5; 10; 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Ao contrário do esperado, o aumento da TCO para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> levou à redução da concentração de AGV no RALF-ST para 682 mg HAc L<sup>-1</sup>, inferior à observada pelo mesmo aumento de TCO no RALF-MT (1364 mg HAc L<sup>-1</sup>). Esta ocorrência foi simultânea à alteração de rotas metabólicas no reator acidogênico, uma vez que, a produção de 1,3-PDO foi cessada nesta condição operacional e foi substituída pelo alongamento de cadeia de HLa e HAc a HBU e hidrogênio. Este novo caminho metabólico no RALF-AT levou à geração de 53 mg L<sup>-1</sup> de HLa, 837 mg L<sup>-1</sup> de HPr, 394 mg L<sup>-1</sup> de HAc e 2620 mg L<sup>-1</sup> de HBU em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Com essa nova constituição de alimentação, a concentração de HPr no efluente do RALF-ST aumentou de valores não detectáveis para 339 mg L<sup>-1</sup>. Este aumento da concentração de HPr pode tanto estar ligado à fermentação de maiores concentrações de glicerol afluente ao RALF-ST (Tabela 24) (ZHANG et al., 2020c), quanto à inibição da atividade de microrganismos pela adição de HPr e HBU em concentrações próximas consideradas tóxicas (900 mg L<sup>-1</sup> de HPr e 1800 mg L<sup>-1</sup> de HBU) (WANG et al., 2009).

Na Tabela 26 estão apresentadas as concentrações de SST e SSV mensuradas no efluente do RALF-ST. Assim como no RALF-MT, no RALF-ST foi observado aumento da concentração de SSV de 23 mg L<sup>-1</sup> para 630 mg L<sup>-1</sup> com o aumento da TCO de 2 para 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Com exceção das concentrações de SSV observadas ao aplicar 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, as concentrações de SSV no efluente do RALF-ST foram similares às

observadas no efluente do RALF-MT (72, 66, 144, 282 e 341 mg SSV L<sup>-1</sup> em 2; 5; 7,5; 10 e 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente). Esta ocorrência pode estar associada ao fato de que as concentrações de sólidos do afluente do RALF-AT foram similares às eliminadas por este reator em 10 e 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e, portanto, também foram similares as observadas para as amostras de afluente do RALF-MT. Por outro lado, em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> os RALF-AT e RALF-MT foram alimentados com 898 mg SSV L<sup>-1</sup>. Porém, o RALF-AT eliminou 1204 mg SSV L<sup>-1</sup>, que afluindo ao RALF-ST levou à concentração de sólidos no efluente de 630 mg L<sup>-1</sup>. Já no RALF-MT foi observado valor médio de concentração de SSV no efluente igual à 974 mg L<sup>-1</sup>. Isto demonstra a influência da qualidade do efluente do RALF-AT na digestão em dois estágios.

Tabela 26. Valores médios da concentração de sólidos nas amostras de efluente do RALF-ST

<b>Etapa</b>	<b>TCO (kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>SST (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SSF (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SSV (mg L<sup>-1</sup>)</b>
1	2	79 ± 29	55 ± 34	23 ± 6
2	5	151 ± 40	102 ± 38	49 ± 9
3	7,5	173 ± 18	59 ± 41	114 ± 22
4	10	543 ± 157	154 ± 55	389 ± 102
5	15	479 ± 124	164 ± 54	316 ± 92
6	20	860 ± 150	230 ± 54	630 ± 118

SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Na Tabela 27 estão apresentados os valores médios de produtividade de metano do RALF-ST, mais especificamente o %CH<sub>4</sub>, a PVM em função do volume de leito fluidificado, a PVM em função do volume total do reator (1,55 L) e o MY. Os comportamentos da PVM<sub>leito</sub> e do MY em função da TCO aplicada podem ser mais bem visualizados na Figura 45 e Figura 46, respectivamente.

Tabela 27. Produção de metano no RALF-ST em função da TCO aplicada

Etapa	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	%CH <sub>4</sub>	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> leito)	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> reator)	MY (mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>remov</sub> )
1	2	79,4 ± 5,5	0,95 ± 0,21	0,34 ± 0,07	184 ± 25
2	5	71,2 ± 3,2	3,49 ± 0,42	1,31 ± 0,14	300 ± 16
3	7,5	64,8 ± 2,9	4,32 ± 0,60	1,91 ± 0,20	258 ± 21
4	10	65,9 ± 5,4	4,36 ± 0,29	2,30 ± 0,24	266 ± 26
5	15	59,8 ± 5,3	8,04 ± 1,03	3,80 ± 0,41	286 ± 26
6	20	64,8 ± 5,5	8,55 ± 0,62	4,53 ± 0,33	270 ± 26

%CH<sub>4</sub>: percentual de metano no biogás; PVM<sub>leito</sub>: produção volumétrica de metano por volume de leite fluidificado; PVM<sub>reator</sub>: produção volumétrica de metano por volume total de reator; MY: rendimento de metano.

O %CH<sub>4</sub> decresceu de 79,4% para 64,8% ao aumentar a TCO de 2 para 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e permaneceu estável entre 59,8% e 65,9% nas demais TCO aplicadas. A redução do %CH<sub>4</sub> ao aumentar TCO é um resultado esperado pois, o acréscimo na concentração de vinhaça levou ao incremento da concentração de sulfato no RALF-ST e a redução do sulfato em sulfeto reduz a qualidade do biogás. Outra possibilidade de redução do %CH<sub>4</sub> é pela acidificação do reator. Bernat et al. (2021) realizaram co-digestão de lixiviado após estabilização aeróbia de resíduos sólidos urbanos e glicerol e observaram %CH<sub>4</sub> igual a 62% em menor concentração de glicerol aplicada (6% v v<sup>-1</sup>) contra 54% em maior adição de glicerol aplicada (13% v v<sup>-1</sup>). Os autores apontaram que a redução do %CH<sub>4</sub> pode estar atrelada ao acúmulo de ácidos devido a maior proporção de glicerol. Então, no RALF-ST, a estagnação do %CH<sub>4</sub> em TCOs superiores a 7,5 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> também pode indicar estabilidade da digestão, uma vez que, o %CO<sub>2</sub> não foi acrescido devido à acidificação do reator.

A PVM<sub>leito</sub> no RALF-ST aumentou de 0,95 em 2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 8,55 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>leito em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, o que indica um aumento praticamente proporcional da PVM<sub>leito</sub> em função da TCO. Uma exceção deste aumento proporcional ocorreu ao incrementar a TCO de 7,5 para 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, em que o acréscimo da PVM<sub>leito</sub> foi de 1% contra 46% ao incrementar a TCO de 10 para 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Esta estagnação da PVM<sub>leito</sub> no RALF-ST

em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  pode estar associada à alimentação do reator com efluente do RALF-AT não diluído. Como foi previamente discutido, o acréscimo significativo das concentrações de 1,3-PDO e sulfato no efluente do RALF-AT utilizado na alimentação do RALF-ST pode ter ocasionado redirecionamento fluxo energético de produção de metano para sulfetogênese.

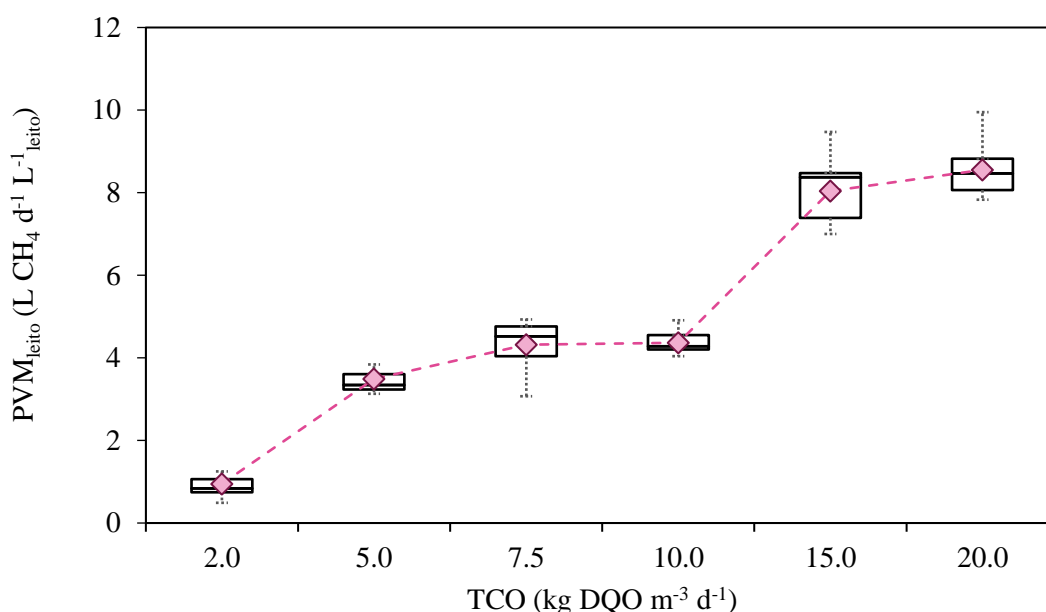


Figura 45. Efeito do aumento da TCO na PVM do RALF-ST

A colaboração do 1,3-PDO para a pior performance de produção de metano no RALF-ST em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  pode ser inferida por meio da comparação entre as  $PVM_{leito}$  do RALF-ST e RALF-MT. As concentrações afluentes de sulfato em ambos os reatores foram elevadas devido ao lote de vinhaça utilizado ( $1811 \text{ mg L}^{-1}$ ). Contudo, como a elevada concentração de 1,3-PDO só foi observada no afluente do RALF-ST, o incremento da TCO de 7,5 para  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  levou ao acréscimo da  $PVM_{leito}$  de 9% no RALF-MT contra 1% no RALF-ST. A partir do aumento da TCO para  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e redução da concentração e sulfato afluente de 1811 para  $457 \text{ mg L}^{-1}$  em ambos os reatores foi observada maior  $PVM_{leito}$  no RALF-ST ( $8,04 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$ ) do que no RALF-MT ( $7,23 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$ ). Porém, o desempenho do RALF-ST se deteriorou novamente em relação ao do RALF-MT ao aumentar a TCO para  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  devido à alimentação do RALF-ST com concentrações potencialmente inibitórias de AGVs oriundas do RALF-AT ( $837 \text{ mg L}^{-1}$  de HPr e  $2619 \text{ mg L}^{-1}$  de HBU). Essas ocorrências reafirmam a influência da performance do RALF-AT na performance do RALF-ST.

Ramos e Silva (2020) compararam a produção de metano em RALF termofílico de estágio único a produção em RALF de estágio duplo termofílico alimentado com efluente de RALF acidogênico termofílico alimentado com vinhaça ( $60 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ). Os autores observaram  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  de  $3,78 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$  em TCO de  $7,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  na digestão de vinhaça em RALF de estágio único. Contudo, o aumento da TCO para  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no RALF de estágio único acarretou decréscimo da  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  para  $1,56 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$ . Já no RALF em dois estágios os autores observaram aumento da  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  de  $3,67$  para  $5,57 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$  ao aumentar a TCO de  $12$  para  $21,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . A  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  observada pelos autores no RALF em dois estágios ( $5,57 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$ ) foi inferior a observada no RALF-ST para concentração de matéria orgânica similar ( $8,83 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$ ). Além disso, enquanto Ramos e Silva (2020) observaram redução da  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  para  $1,56 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ leito}$  ao incrementar a TCO para  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , a  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  máxima no RALF-MT foi observada em  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e foi superior a  $\text{PVM}_{\text{leito}}$  observada no RALF-ST e no RALF de dois estágios utilizados na digestão de vinhaça.

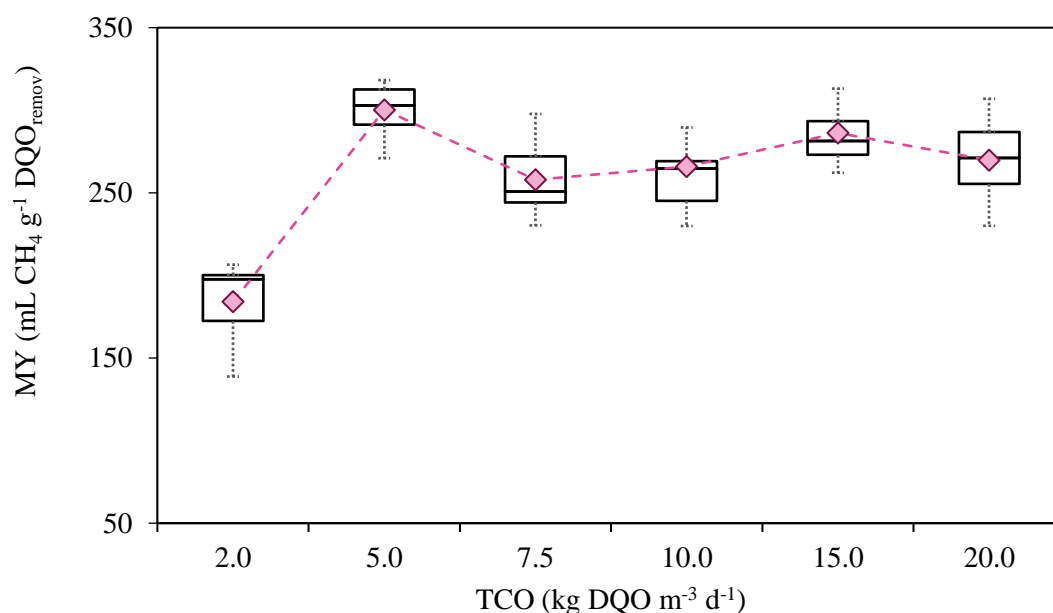


Figura 46. Efeito do aumento da TCO no MY do RALF-ST

O valor médio de MY em  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi de  $184 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  e foi similar ao observado na mesma condição operacional no RALF-MT ( $170 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ). Na co-digestão de vinhaça e glicerol em um estágio essa ocorrência foi associada ao fato da TCO aplicada estar abaixo da mínima requerida para as atividades metabólicas dos

microrganismos no reator. De fato, o aumento da TCO para  $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  levou ao aumento do MY para  $300 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ . O MY observado no RALF-ST em  $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi superior ao observado no RALF-MT ( $264 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ) e pode estar associado à substituição da alimentação do RALF-ST de vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO) para efluente do RALF-AT diluído. Neste caso, a acidificação no RALF-AT (grau de acidificação igual a 33%) associada a diluição de compostos potencialmente inibitórios e menor concentração de sulfato contribuíram para incremento do MY em relação ao RALF-MT e às demais condições operacionais do RALF-ST.

O consumo de matéria orgânica na sulfetogênese se configura como via competidora por substrato, uma vez que, este deixa de ser direcionado à produção de metano (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017). Considerando o consumo de  $0,67 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$  infere-se que o MY foi diminuído de 14 a  $18 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  no RALF-ST devido à sulfetogênese (Equação 5.1). A partir do conhecimento dessa diminuição do MY pela sulfetogênese é possível considerar que o MY foi estável no RALF-ST em todas as TCO aplicadas. Nesse sentido, a adição de glicerina a digestão em dois estágios teve o efeito benéfico de reduzir pela metade a concentração de sulfato em comparação a mono-digestão de vinhaça para uma mesma carga. Ramos et al. (2021) realizaram a mono-digestão de vinhaça em dois estágios, também utilizando RALFs termofílicos, e observaram redução dos valores médios de MY de 270 para  $170 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  e  $150 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  ao incrementar a TCO de 8 para 18 e  $24,7 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Os valores de MY observados por Ramos et al. (2021) foram significativamente inferiores aos máximos observados no RALF-ST em  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $313 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ) e  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  ( $307 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ).

### 5.3.2 Remoção de matéria orgânica e produção de metano no RALF-SM

O RALF-SM foi mantido sob temperatura ambiente ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e alimentado com concentração de cossustratos acrescida de 2 para  $20 \text{ g DQO L}^{-1}$  em TDH fixo de 24 h. Assim como o RALF-ST, o RALF-SM foi inicialmente alimentado com vinhaça e glicerina (50%: 50% em base DQO) em  $2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . A partir do aumento da TCO para  $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a alimentação foi substituída por efluente do RALF-AT ( $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) diluído. A mesma diluição do efluente do RALF-AT ( $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) foi realizada para alimentação do RALF-SM em  $7,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Nas etapas de 10, 15 e  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  o efluente do RALF-AT foi aplicado sem diluição na alimentação dos RALF-ST e RALF-SM. A alteração de condições operacionais de ambos RALF-ST e RALF-SM foram realizadas simultaneamente.

### 5.3.2.1 Efeito do aumento da TCO no desempenho do RALF-SM

Os valores médios de concentrações de glicerina, carboidrato totais e matéria orgânica das amostras de afluente e efluente do RALF-SM estão apresentados na Tabela 28. Os perfis das eficiências de remoção de carboidratos totais, glicerina e matéria orgânica estão apresentados na Figura 47.

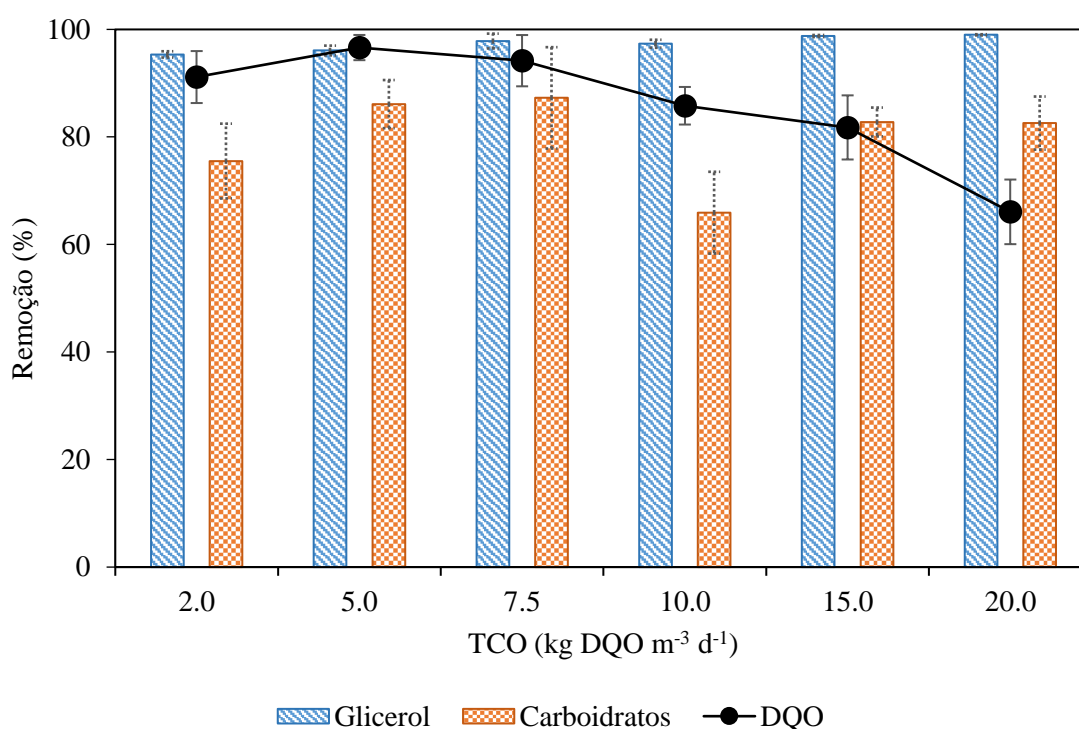


Figura 47. Efeito do aumento da TCO nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-SM

A eficiência de remoção de carboidratos permaneceu entre 82,6% e 87,3% em maior parte das condições operacionais no RALF-SM, exceto 2 (75,5%) e 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (65,9%). No entanto, é válido mencionar que a performance do RALF-SM quanto à conversão de carboidratos foi superior às performances do RALF-ST e RALF-MT em todas as TCO aplicadas. Em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, os valores médios de remoção de carboidratos no RALF-SM foram similares aos do RALF-ST, indicando influência da qualidade do efluente acidogênico na performance na metanogênese em dois estágios. A eficiência de remoção de glicerina permaneceu superior a 95% em todas as TCOs aplicadas ao RALF-SM. Estes



resultados apontam para a elevada atividade de microrganismos acidogênicos em TCOs elevadas.

Os valores de eficiência de remoção de matéria orgânica do RALF-SM (85,8% - 96,6%) foram superiores aos observados para os RALF-ST (82,1% - 91,7%) e RALF-MT (75,5% - 92,4%) em TCOs inferiores a 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Isto pode ter ocorrido devido a maior diversidade geral da microbiota mesofílica em relação à termofílica (PAP et al., 2015). Com a maior diversidade da microbiota a degradação de compostos recalcitrantes pode ter sido facilitada no RALF-SM em relação aos RALF-ST e RALF-MT. Ramos et al. (2021) também observaram que as eficiências de remoção de matéria orgânica em RALF de segundo estágio mesofílico (79%) foram superiores as observadas em RALF de segundo estágio termofílico (69%) em 18 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O melhor desempenho de reatores mesofílicos em relação a mesofílicos está associado as características do substrato e ocorrem quando a taxa de hidrólise não é fator limitante (CHEN et al., 2020).

Os desempenhos observados por Ramos et al. (2021) em mono-digestão de vinhaça em dois estágios e no RALF-SM em relação ao RALF-ST indicam que a hidrólise da vinhaça não é fator limitante para a digestão deste substrato. Além disso, os maiores valores de remoção de matéria orgânica do RALF-SM (81,8%) em relação ao RALF mesofílico de Ramos et al. (2021) (79%) podem ser atribuídos ao favorecimento da digestão mesofílica pelo aumento da biodegradabilidade conferido pela adição de glicerol. Silva et al. (2018) aplicaram a glicerina como co substrato para produção de metano a partir de resíduos alimentares em estágio duplo sob condição mesofílica (35 °C) e observaram que a adição de 1% (v/v) de glicerina acarretou eficiência de remoção de matéria orgânica no reator metanogênico igual 61%, superior à remoção de DQO do reator sem a adição de glicerina (49%).

Tabela 28. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais, glicerina e DQO em função da TCO aplicada ao RALF-SM

Etapa	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Carb <sub>aflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Carb <sub>eflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Glic <sub>aflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Glic <sub>eflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>aflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	DQO <sub>eflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
1	2	122 ± 51	30 ± 13	888 ± 103	41 ± 5	2110 ± 259	189 ± 23
2	5	177 ± 64	25 ± 9	1210 ± 299	47 ± 12	4868 ± 511	166 ± 17
3	7,5	319 ± 85	41 ± 11	2335 ± 892	51 ± 20	7990 ± 569	463 ± 33
4	10	325 ± 117	111 ± 40	2719 ± 905	73 ± 24	10553 ± 1274	1499 ± 181
5	15	1034 ± 251	174 ± 33	6544 ± 583	79 ± 5	17425 ± 2414	3111 ± 763
6	20	839 ± 154	140 ± 20	8229 ± 744	82 ± 4	20005 ± 3156	6693 ± 1066

TCO: taxa de carregamento orgânico; C<sub>aflu/eflu</sub>: concentração de carboidratos afluente/efluente; Glic<sub>aflu/eflu</sub>: concentração de glicerol afluente/efluente; DQO<sub>aflu/eflu</sub>: demanda química de oxigênio afluente/efluente.

Apesar dos valores elevados de eficiências de conversão de carboidratos totais e glicerina em TCOs superiores a  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi observada redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 85,8% em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para 66,1% em  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no RALF-SM. Uma associação direta pode ser feita em relação as conversões de carboidratos e glicerina e a redução da eficiência de remoção de matéria orgânica em TCOs elevadas no RALF-SM. As elevadas conversões de carboidratos e glicerina, além de outros compostos de difícil degradação não contabilizados, em reator mesofílico pode originar em maior variabilidade de metabólitos produzidos na fase líquida. Porém, a velocidade de degradação de matéria orgânica depende da redução da variabilidade de metabólitos. Então, os ácidos tendem a se acumular e inibir a atividade metanogênica. Em contrapartida, uma faixa mais estreita de metabólitos produzidos em condição termofílica pode contribuir para a degradação de matéria orgânica (ZHANG et al., 2020b). Além disso, a taxa de degradação por metanogênicos é mais elevada em condição termofílica (BEGUM et al., 2020). Isto explica o fato de a eficiência de remoção de matéria orgânica no RALF-ST ter sido de 79,2% em  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  contra 66,1% no RALF-SM.

No RALF-SM o pH efluente permaneceu entre 7,6 e 8,2 em todas as TCOs aplicadas. Contudo, é válido mencionar que em TCOs de 2 a  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a adição de  $0,05 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$  na alimentação dos reatores foi realizada de forma esporádica. Em  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  a manutenção do pH foi realizada por meio da adição diária de  $0,05 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$  aos tanques de alimentação. Porém, em  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi necessário o aumento da adição de alcalinizante para  $0,20 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO L}^{-1}$ . O aumento da necessidade de alcalinizante para a manutenção do pH pode ser considerado um indício do acúmulo de ácidos no RALF-SM na última condição operacional. De fato, a concentração de AGV e a relação AI/AP aumentaram para  $1364 \text{ mg HAc L}^{-1}$  e 0,90, respectivamente, ao incrementar a TCO para  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Tabela 29). A relação AI/AP de 0,90 indica que o RALF-SM atingiu o limite operacional, uma vez que, relações AI/AP acima de 0,5 indicam instabilidade da digestão (BALAGUER; VICENT; PARÍS, 1992).

Os valores de concentração de AGV ( $599 \text{ mg HAc L}^{-1}$ ) e relação AI/AP (0,25) da operação do RALF-SM, enquanto a remoção de matéria orgânica, foram inferiores aos observados nos RALF-MT ( $1.124,4 \text{ mg HAc L}^{-1}$  e 0,41) e RALF-ST ( $1.172,5 \text{ mg HAc L}^{-1}$  e 0,46). Nessas mesmas TCOs o requerimento de alcalinizante foi superior para os reatores termofílicos ( $0,10 \text{ g NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) em relação ao mesofílico. Similarmente, Doll e Foresti (2010) compararam a digestão termofílica ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e a digestão mesofílica ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de vinhaça de cana-de-açúcar em AnSBBR e observaram que para a estabilização do processo anaeróbio

no reator termofílico foram necessários de  $0,60 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}} - 1,20 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ , enquanto no reator mesofílico foram necessários entre  $0,20 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}} - 0,40 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ . Silvestre, Fernández e Bonmatí (2015) observaram relação AI/AP 0,80 em reator termofílico (55 °C) e relação AI/AP 0,31 em reator mesofílico (35 °C) na co-digestão de glicerina e lodo de esgoto doméstico em CSTR. Neste caso, a digestão em dois estágios termofílico - mesofílico é uma alternativa para redução do gasto operacional com alcalinizantes para TCOs inferiores a  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

Tabela 29. Valores médios de AGV e relação AI/AP nas amostras de efluente do RALF-SM

Etapa	TCO ( $\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ )	AGV <sub>efluente</sub> ( $\text{mg HAc L}^{-1}$ )	AI/AP <sub>efluente</sub>
1	2	$81 \pm 32$	$0,40 \pm 0,12$
2	5	$116 \pm 31$	$0,30 \pm 0,08$
3	7,5	$119 \pm 59$	$0,32 \pm 0,10$
4	10	$599 \pm 37$	$0,25 \pm 0,10$
5	15	$1244 \pm 155$	$0,30 \pm 0,10$
6	20	$1279 \pm 257$	$0,90 \pm 0,30$

AGV<sub>eflu</sub>: ácidos graxos voláteis efluente; AI: alcalinidade intermediária; AP: alcalinidade parcial.

Outro indicativo na instabilidade da digestão no RALF-SM em TCO superior a  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  é o perfil de metabólitos gerados. Nuchdang e Phalakornkule (2012) apontaram que a falha do sistema ocorre em relação HPr/HAc de 1,4. O aumento da TCO de 10 para  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  levou ao aumento das concentrações de HPr e HAc de valores não detectados para  $911 \text{ mg L}^{-1}$  e  $188 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Com o posterior aumento da TCO para  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foi observada estabilidade na geração de HPr ( $812 \text{ mg L}^{-1}$ ) e HAc ( $195 \text{ mg L}^{-1}$ ). Portanto, este perfil de metabólitos corrobora a afirmação de falha no sistema em TCO superiores à  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no RALF-SM.

As concentrações de SSV nas amostras de efluente do RALF-SM estão apresentadas na Tabela 30.

Tabela 30. Valores médios da concentração de sólidos nas amostras de efluente do RALF-SM

<b>Etapa</b>	<b>TCO</b> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	<b>SST</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>SSF</b> (mg L <sup>-1</sup> )	<b>SSV</b> (mg L <sup>-1</sup> )
1	2	54 ± 21	44 ± 14	9 ± 7
2	5	113 ± 27	108 ± 21	5 ± 2
3	7,5	107 ± 30	39 ± 17	68 ± 12
4	10	408 ± 124	187 ± 32	221 ± 92
5	15	435 ± 130	195 ± 70	240 ± 79
6	20	1017 ± 203	249 ± 63	768 ± 147

SST: sólidos suspensos totais; SSF: sólidos suspensos fixos; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Em 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, a concentração média de SSV nas amostras de efluente do RALF-SM foi similar à observada no RALF-ST. Então, além da influência da qualidade do efluente do RALF-AT na digestão em dois estágios termofílica também é possível inferir influência da qualidade do efluente do RALF-AT na digestão em dois estágios mesofílica. Contudo, o aumento da concentração de SSV no efluente do RALF-SM foi inferior aos observados nos RALF-ST e RALF-MT. Uma hipótese para esta ocorrência é de que a lise das células e, portanto, a liberação no efluente foi maior sob condição termofílica. Kim, Ahn e Speece (2002) relataram que a taxa de decaimento de culturas termofílicas é o dobro das mesofílicas porque as células tendem a se romper rapidamente sob condições termofílicas.

O reflexo da lise celular é o redirecionamento de maior energia e carbono para o anabolismo (KIM; AHN; SPEECE, 2002), reduzindo o MY. De fato, os valores de %CH<sub>4</sub> observados no RALF-SM (Tabela 31) foram similares aos de estudos que realizaram a monodigestão mesofílica de vinhaça em estágio único (49,5%-77,0%) (ALBANEZ et al., 2016) e em dois estágios (52% - 86%) (RAMOS et al., 2021), e de glicerina em estágio único (64% - 75%) (T.B. COSTA et al., 2021) e em dois estágios (63,9%-71,8%) (DOUNAVIS et al., 2016). Além disso, os resultados de PVM do RALF-SM (Tabela 31) foram similares aos do RALF-ST (Tabela 27) até 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Contudo, o MY máximo sob condição mesofílica (323,7 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) foi superior ao máximo observado em condição termofílica (300,3 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>). Isto indica que uma maior fração da matéria orgânica inserida no reator foi redirecionada para crescimento celular no RALF-ST do que no RALF-SM.

Tabela 31. Produção de metano no RALF-SM em função da TCO aplicada

Etapa	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	%CH <sub>4</sub>	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> leito)	PVM (L CH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> reator)	MY (mL CH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO <sub>remov</sub> )
1	2	73,8 ± 4,6	0,37 ± 0,06	0,14 ± 0,02	76,9 ± 13,3
2	5	70,6 ± 2,5	3,19 ± 0,50	1,34 ± 0,14	285,8 ± 27,0
3	7,5	67,4 ± 2,3	4,00 ± 0,69	1,99 ± 0,14	264,3 ± 18,8
4	10	71,4 ± 3,1	4,79 ± 1,37	2,93 ± 0,35	323,7 ± 13,7
5	15	66,2 ± 5,9	8,18 ± 0,49	3,85 ± 0,44	269,3 ± 20,1
6	20	67,4 ± 12,4	6,32 ± 0,84	3,85 ± 0,45	268,8 ± 41,7

%CH<sub>4</sub>: percentual de metano no biogás; PVM<sub>leito</sub>: produção volumétrica de metano por volume de leito fluidificado; PVM<sub>reator</sub>: produção volumétrica de metano por volume total de reator; MY: rendimento de metano.

Apesar da PVM<sub>leito</sub> do RALF-SM ter aumentado linearmente com o aumento da TCO até 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 48) e a média dos valores estar dentre as observadas no RALF-ST (Figura 45), é válido mencionar que a PVM<sub>leito</sub> do RALF-SM em 2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foi quase 3-vezes menor do que a observada no RALF-ST. O mesmo ocorreu com o MY (Figura 49), que foi de 77 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> no RALF-SM e 184 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> no RALF-ST. Os menores valores de MY de ambos RALF-SM e RALF-ST em relação ao teórico 350 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> podem estar associados a alteração do modo de operação dos reatores de batelada para contínuo. Nesta alteração ocorre lavagem da biomassa não-imobilizada do reator. Então, parte da energia é direcionada para crescimento celular e síntese da estrutura polimérica do biofilme (EPS). Além disso, as baixas TCOs aplicadas podem ter sido insuficientes para garantir manutenção simultânea da regeneração celular, sulfetogênese e metanogênese em reatores de alta-taxa como os RALF do presente estudo. Contudo, a diferença entre as PVM<sub>leito</sub> e MY do RALF-SM em relação ao RALF-ST pode ser relacionada a origem do inóculo mesofílico, i. e., enquanto o inóculo termofílico foi oriundo do tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar o mesofílico foi oriundo do tratamento de águas residuárias de abatedouro. Portanto, o inóculo termofílico estava mais adaptado as peculiaridades dos substratos adicionados, uma vez que, o glicerol é um componente da vinhaça de cana-de-açúcar.

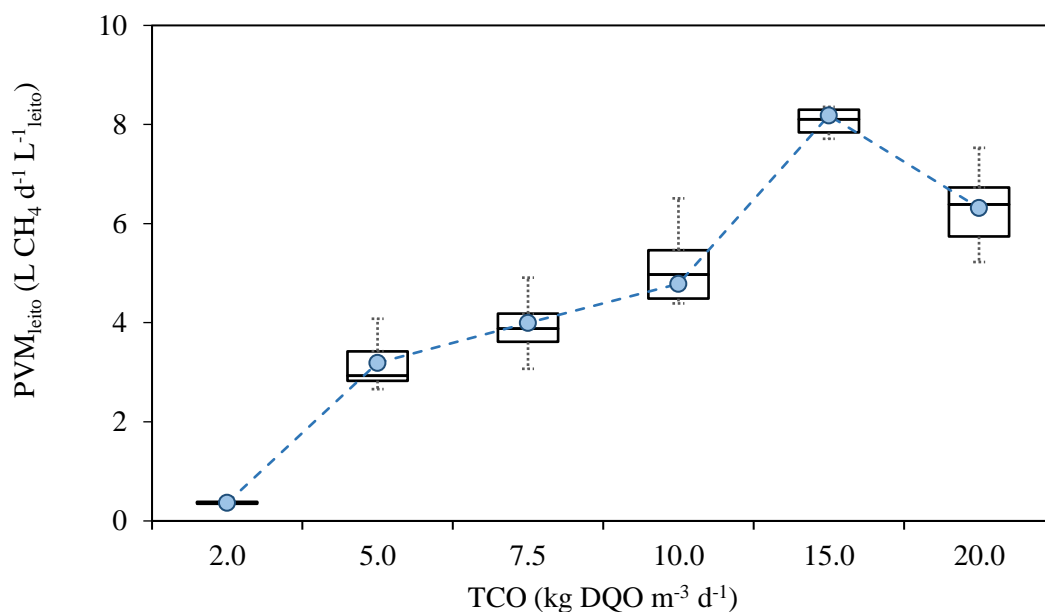


Figura 48. Efeito do aumento da TCO na PVM do RALF-SM

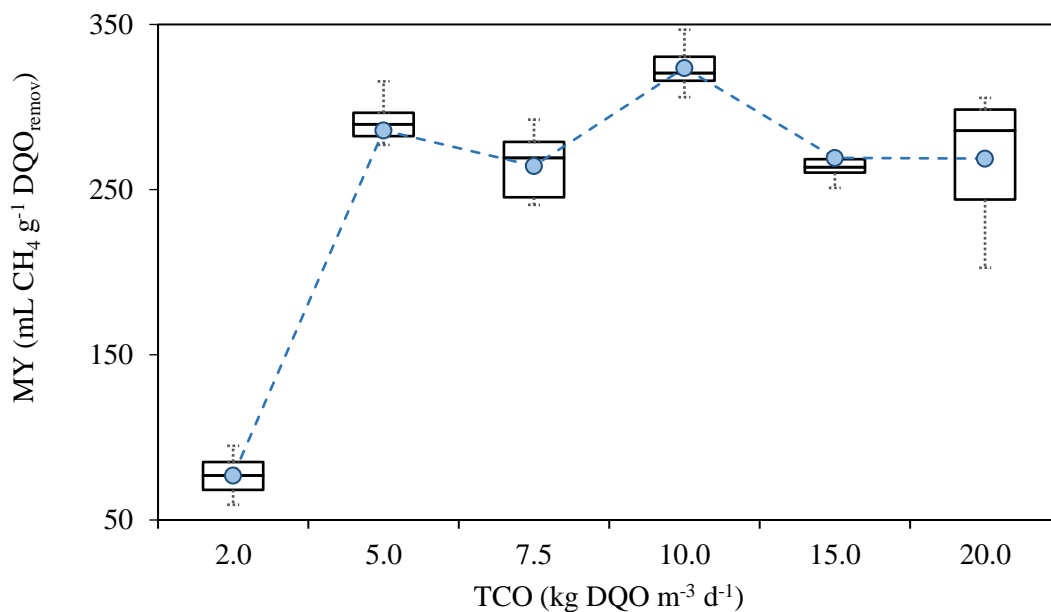


Figura 49. Efeito do aumento da TCO no MY do RALF-SM

A insuficiência das baixas TCOs aplicadas na manutenção simultânea da regeneração celular, sulfetogênese e metanogênese no RALF-SM é confirmada a partir do aumento da PVM<sub>iteio</sub> com o aumento da TCO de 2 para 15 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 48). Similarmente, Tangkathitipong et al. (2017) observaram aumento da PVM para 0,67 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> e do MY

para  $79 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  ao aumentar a TCO de 5,63 para  $11,25 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  em ASBR mesofílico ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de estágio duplo. Ao utilizar vinhaça como substrato para produção de metano em AnSBBR mesofílico ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ), Almeida et al. (2017) observaram aumento da PVM para  $2,77 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  ao aumentar a TCO para  $10,07 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Cabrera-Díaz et al. (2017) realizaram a digestão mesofílica ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de vinhaça de cana-de-açúcar em reator UASB. O efluente do reator UASB foi subsequentemente adicionado a um APBR também mesofílico ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Os autores observaram aumento do MY de 222 para  $289 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  ao aumentar a TCO de 2,3 para  $12,5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  no APBR.

Apesar da aparente falha do RALF-SM em TCO superiores a  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , o desempenho da co-digestão termofílica - mesofílica de vinhaça e glicerol superou o desempenho da mono-digestão termofílica - mesofílica de vinhaça (RAMOS et al., 2021). Enquanto os valores médios de  $\text{PVM}_{\text{reator}}$  e MY no RALF-SM foram de  $3,85 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $269 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  em  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, os valores médios observados por Ramos et al. (2021) em  $18 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  foram de  $2,1 \text{ L CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e  $150 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ , respectivamente.

### 5.3.3 Composição microbiana nos RALF-ST e RALF-SM em $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$

A distribuição taxonômica a nível de domínio da biomassa extraída em estado estacionário de produção de metano e remoção de matéria orgânica nos RALF-ST e RALF-SM em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  está apresentada na Figura 50. A maioria das leituras foi atribuída ao Domínio Bacteria nos RALF-ST (94,2%) e RALF-SM (92,3%). Por sua vez, 5,8% e 7,6% das leituras foram atribuídas ao Domínio Archaea nos RALF-ST e RALF-SM, respectivamente. Em ambos os reatores os representantes de Vírus e do Domínio Eukarya apresentaram abundâncias relativas inferiores a 0,1%. Bacteria como o principal domínio filogenético é um resultado esperado. No estudo de Zahedi et al. (2016) os microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria contabilizaram 71% das leituras, contra menos de 30% atribuídos a Archaea. Porém, maior abundância relativa de Bacteria podem indicar acúmulo de ácidos nos reatores (TOLEDO-CERVANTES et al., 2018). Coincidentemente, a maior abundância relativa de Bacteria no RALF-ST ocorreu simultaneamente à menor remoção de matéria orgânica (82,1%) em relação ao RALF-SM (85,8%).



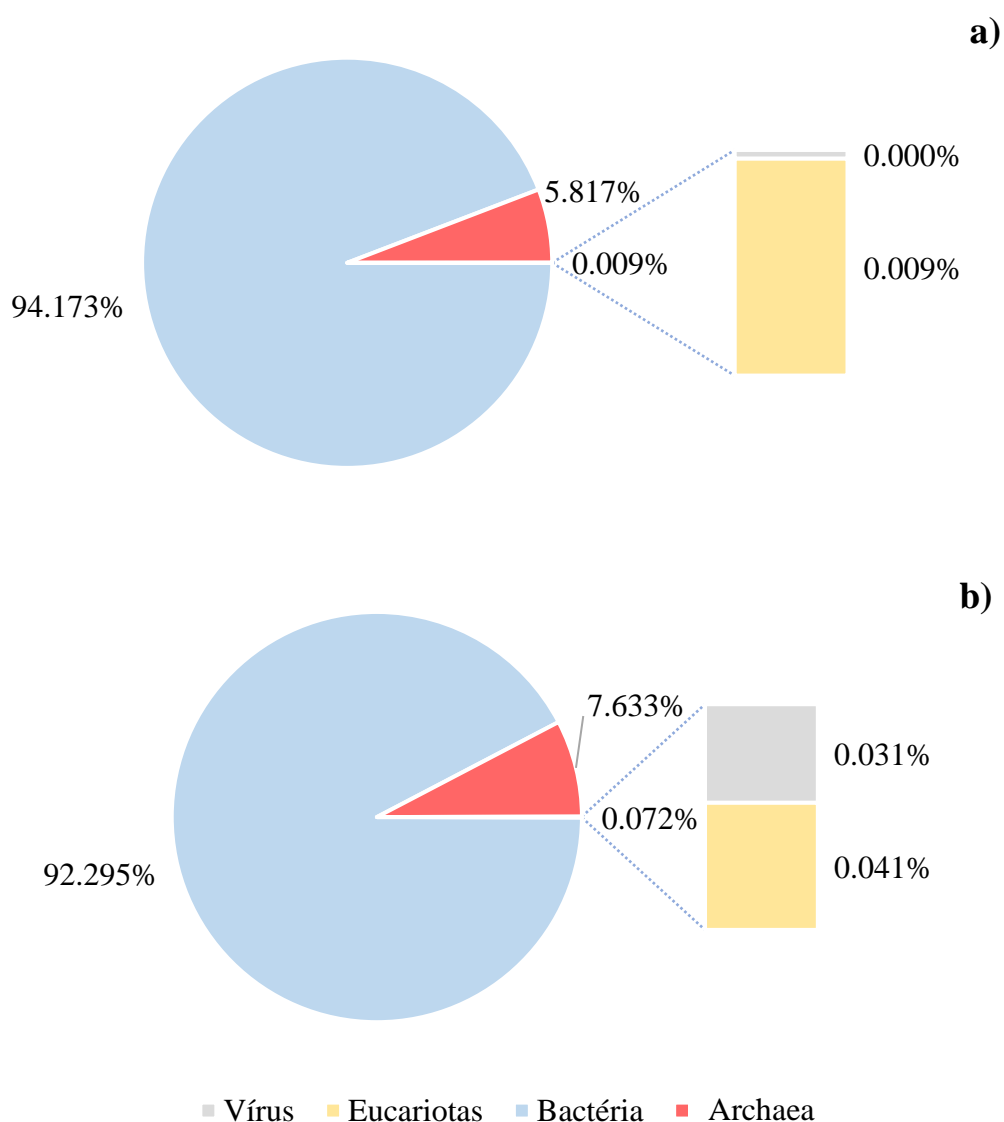


Figura 50. Perfil taxonômico em nível de domínio da biomassa extraída do meio suporte dos a) RALF-ST e b) RALF-SM em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

Em relação aos microrganismos do Domínio Bacteria, os principais representantes no RALF-ST foram atribuídos aos filos Firmicutes, Nitrospirae, Thermotogae e Synergistetes (Figura 51). No RALF-SM os principais representantes foram atribuídos aos filos Firmicutes, Proteobacteria e Thermotogae (Figura 52). Apesar de condições similares de hidrodinâmica e temperatura, as leituras da biomassa do RALF-ST a nível de filo se diferenciaram das leituras do RALF-MT. Enquanto o filo com maior abundância relativa na co-digestão de vinhaça e glicerina em um estágio foi Bacteroidetes (31%), na digestão termofílica em dois estágios foi Firmicutes (30%). A maior abundância relativa de Bacteroidetes foi associada a necessidade de degradação de compostos recalcitrantes presentes na vinhaça no RALF-MT. Porém, o RALF-

ST foi alimentado com substrato parcialmente degradado. Além disso, a composição da biomassa do RALF-ST refletiu a elevada abundância relativa de Firmicutes do RALF-AT.

A elevada abundância relativa de Firmicutes no RALF-AT foi resultado das condições operacionais adversas importadas a este reator, como: tratamento térmico do lodo de inóculo, pH abaixo de 5,0 e TDH de 4 h. Schievano et al. (2012) também observaram que a biomassa extraída do reator de um estágio foi mais diversa do que a do reator metanogênico de dois estágios e que a composição microbiana do reator acidogênico teve grande influência na composição do reator metanogênico de dois estágios. Esta influência pode ser reafirmada para a co-digestão de vinhaça e glicerol ao observar que a abundância relativa a nível de filo do RALF-ST (30% Firmicutes, 16% Thermotogae) se assemelhou mais à do RALF-SM (39% Firmicutes, 16% Thermotogae), operado em condição mesofílica, do a do RALF-MT (31% Bacteroidetes, 25% Firmicutes, 21% Proteobacteria).

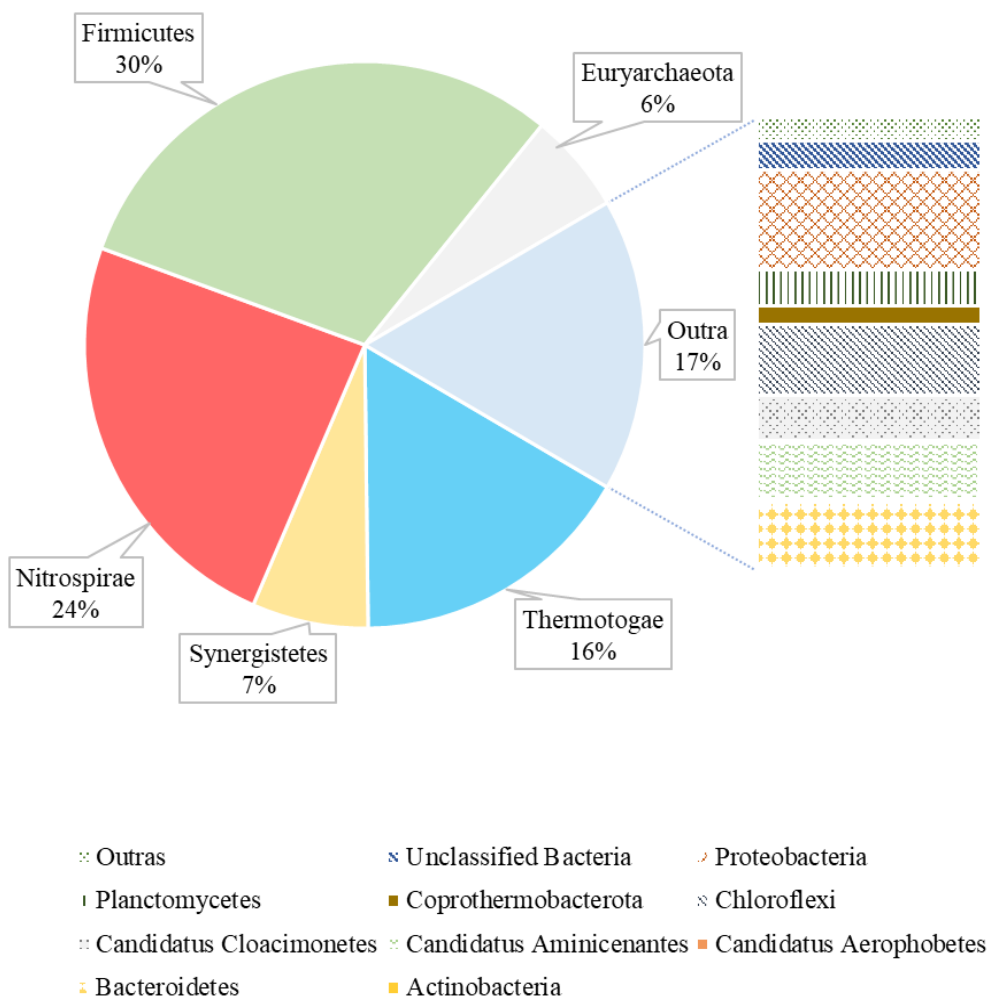


Figura 51. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-ST em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C

A influência da composição microbiana do RALF-AT na composição do RALF-SM é evidenciada ao observar a abundância relativa de Thermotogae (16% de todas as leituras). Os microrganismos deste filo foram previamente identificados nas amostras de lodo mesofílico de abatedouro de aves (VILELA et al., 2021), mesmo inóculo utilizado no RALF-SM. Porém, a manutenção de abundância relativa em 16% após 355 dias de operação em temperatura ambiente pode ser justificada pela reinserção constante por meio do efluente acidogênico, uma vez que, o estabelecimento de microrganismos desse filo é normalmente associado a condições termofílicas (MADIGOU et al., 2019; LIM et al., 2020).

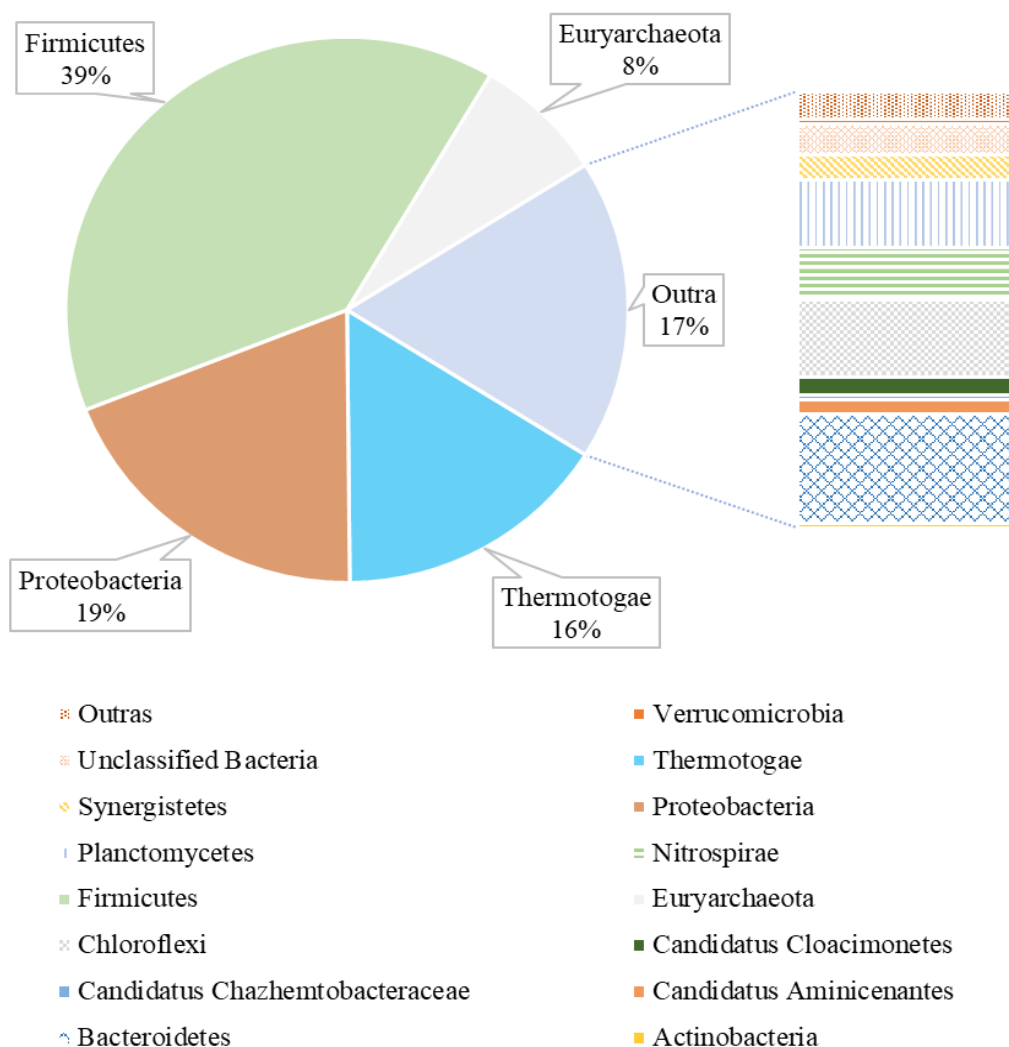


Figura 52. Perfil taxonômico em nível de filo da biomassa extraída do meio suporte do RALF-SM em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Na Figura 53 e Figura 54 estão apresentados os principais gêneros identificados na análise da biomassa extraída do meio suporte dos RALF-ST e RALF-SM.

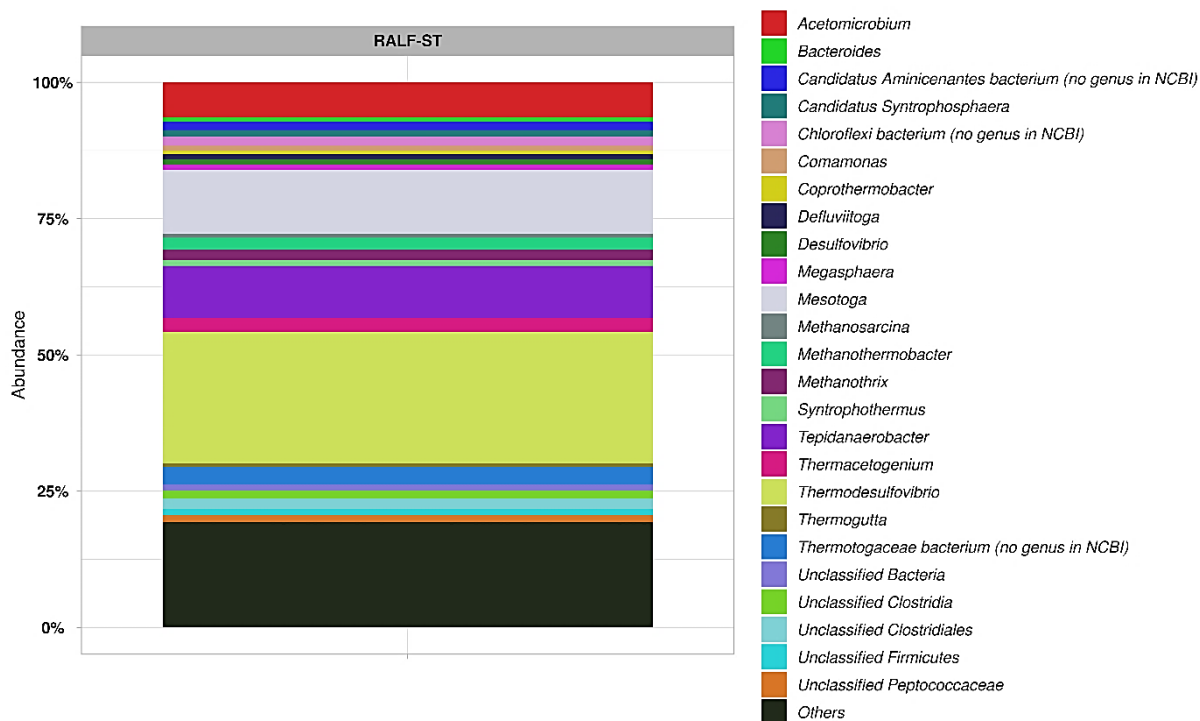


Figura 53. Abundância relativa dos 15 principais gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-ST em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $55 \text{ }^\circ\text{C}$

Apesar da diferença de temperatura de operação dos reatores foi observada composição similar também a nível de gênero nos RALF-ST e RALF-SM. Os principais representantes em ambos os reatores foram atribuídos aos gêneros *Thermotogaceae bacterium* (no genus in NCBI), *Thermodesulfovibrio*, *Tepidanaerobacter*, *Methanotherrix*, *Mesotoga*, *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Citrobacter* e *Acetomicrobium*. Lin et al. (2016) avaliaram o efeito da temperatura na abundância relativa, nas atividades e interações de microrganismos em digestão anaeróbia. Similarmente ao observado entre os RALF-ST e RALF-SM, os autores indicaram que os microrganismos identificados em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  foram similares aos identificados em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Contudo, o número de OTUs foi superior para em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  (195) quando comparado a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (90). Além disso, a abundância relativa dos indivíduos de cada gênero também variou de acordo com a temperatura de operação.

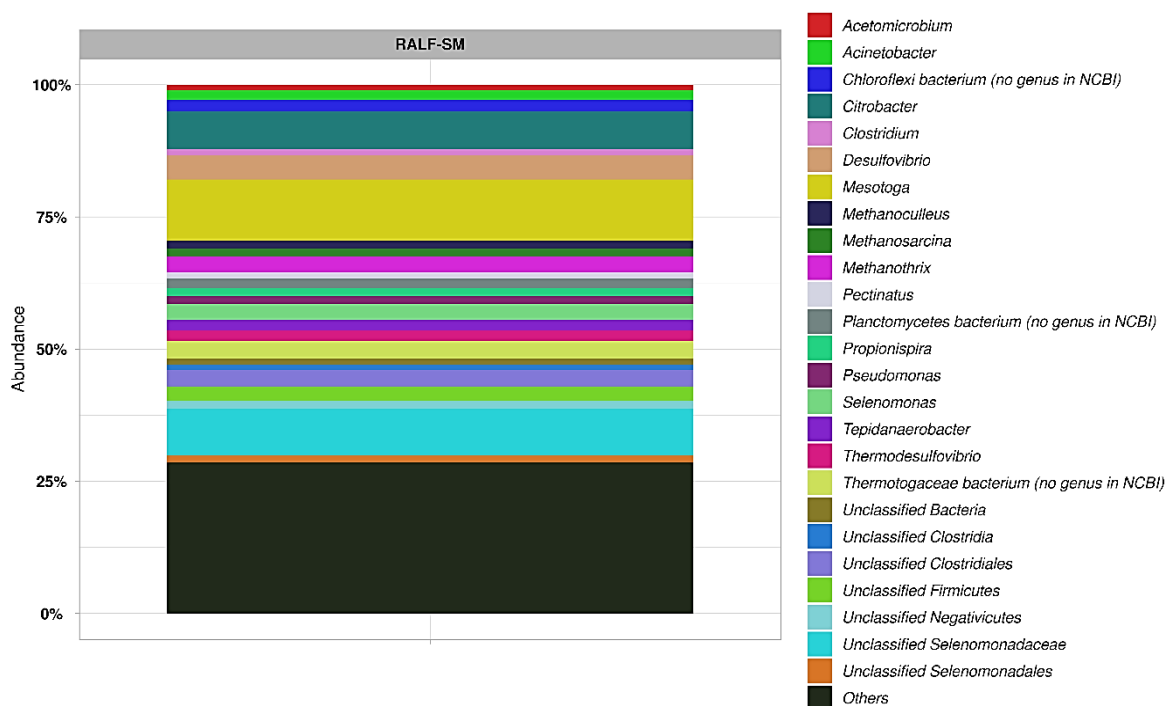


Figura 54. Abundância relativa dos 15 principais gêneros identificados na biomassa extraída do meio suporte do RALF-SM em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

A abundância relativa de microrganismos pertencentes ao gênero *Acetomicrobium* foi de 6,4% no RALF-ST (93% das Synergistetes) e 0,3% no RALF-SM. Os microrganismos pertencentes ao gênero *Acetomicrobium* foram previamente identificados na digestão termofílica de efluente acidogênico de reator alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar (NIZ et al., 2021), corroborando a sua maior abundância relativa no RALF-ST em relação ao RALF-SM. E, apesar do RALF-ST ter sido alimentado com substrato acidificado, o RALF-AT não foi capaz de degradar parte do substrato adicionado. Isto justifica *Acetomicrobium*, uma vez que, estes microrganismos realizam a fermentação de hexoses e pentoses em acetato, HLa, EtOH,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (JIANG et al., 2021). No caso do RALF-SM, a função de degradar o substrato não degradado no RALF-AT pode ter sido desempenhada por *Citrobacter*. Os microrganismos pertencentes ao gênero *Citrobacter* constituíram 2% de Bacteria e 19% de Proteobacteria no RALF-SM e 0,1% de Bacteria no RALF-ST. *Citrobacter* foram previamente identificados na biomassa de reator no qual foi realizada a conversão de vinhaça a ácidos orgânicos em condição mesofílica (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021a). Apesar de serem indicadas como bactérias produtoras de hidrogênio (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021a), os microrganismos pertencentes a esse gênero também são associados a conversão de glicerol a 1,3-PDO, uma rota conhecida por ser contrária à formação de hidrogênio (SUN et al., 2018). Então, a presença de

*Citrobacter* é justificada em reator que realizou a digestão de efluente da fermentação de vinhaça e glicerol.

No caso dos microrganismos pertencentes ao gênero *Mesotoga*, a abundância relativa no RALF-ST (11,7%) foi similar a observada no RALF-SM (11,5%). Diferentemente dos reatores do presente estudo, Chen et al. (2020) identificaram abundância relativa de bactérias pertencentes ao gênero *Mesotoga* igual a 24% em reator mesofílico contra 5% no reator termofílico utilizados no tratamento da fase aquosa gerada a partir da liquefação hidrotérmica do talo de milho. Os autores atribuíram a identificação de microrganismos pertencentes ao gênero *Mesotoga* à elevada remoção de matéria orgânica no reator mesofílico (61,5%) em relação ao termofílico (45,0%). A similaridade da abundância relativa de bactérias do gênero *Mesotoga* nos RALF-ST e RALF-SM foi acompanhada por valores similares de eficiência de remoção de matéria orgânica (82,1% e 85,8%, respectivamente).

Assim como foi observado para os microrganismos pertencentes ao gênero *Acetomicrobium*, os microrganismos pertencentes aos gêneros *Tepidanaerobacter* e *Thermodesulfovibrio* apresentaram abundância relativa superior no RALF-ST (9,5% e 24,0%, respectivamente) em relação ao RALF-SM (1,9% e 2,1%, respectivamente). *Tepidanaerobacter* são gram-negativos, imóveis, não-formadores de esporos, estritamente anaeróbios, moderadamente termofílicos e degradam H<sub>2</sub>Bu, H<sub>2</sub>La e H<sub>2</sub>Ac quando em co-cultura com arqueias hidrogenotróficas (SEKIGUCHI et al., 2006). Similarmente, os microrganismos pertencentes ao gênero *Thermodesulfovibrio* são capazes de se desenvolver em co-cultura com microrganismos hidrogenotróficos como *Methanothermobacter* (DONG et al., 2018).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Thermodesulfovibrio* e *Desulfovibrio* estão dentre as linhagens filogenéticas de bactérias redutoras de sulfato comuns em reatores termofílicos e mesofílicos, respectivamente. As abundâncias relativas das bactérias do gênero *Desulfovibrio* foram iguais a 0,8% no RALF-ST e 4,5% no RALF-SM, compensando a maior abundância de bactérias do gênero *Thermodesulfovibrio* no RALF-ST. A presença de representantes desses gêneros pode justificar a remoção total do sulfato afluente aos reatores (1227 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>). Adicionalmente, a redução de sulfato pode ter auxiliado na degradação do 1,3-PDO afluente (1559 mg L<sup>-1</sup>) em ambos os reatores. Isso pode ter ocorrido porque a degradação anaeróbia de produtos reduzidos requer a redução de aceptores de elétrons como o sulfato (OPPENBERG; SCHINK, 1990). Oppenberg e Schink (1990) apontaram bactérias do gênero *Desulfovibrio* como responsáveis pela degradação de 1,3-PDO, resultando em acetato e sulfeto como produtos. Qatibi, Bories e Garcia (1990) também relataram que a presença de sulfato possibilita a oxidação de HPr por *Desulfovibrio*.

A oxidação de álcoois e ácidos é energeticamente desfavorável (Tabela 32) e depende da utilização de hidrogênio por bactérias acetogênicas e por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas. Apesar de microrganismos acetogênicos serem diversos, estas bactérias são em maioria filogeneticamente associadas a Firmicutes (HATTORI, 2008), filo mais abundante nos RALF-ST e RALF-SM. Por outro lado, microrganismos relacionados a este filo também podem ter desempenhado papel reverso em relação ao acetato, i. e., oxidação do acetato em hidrogênio e CO<sub>2</sub> (WESTERHOLM et al., 2011). Tanto a oxidação de acetato por bactérias sintróficas oxidadoras de acetato (*syntrophic acetate-oxidizing bacteria* - SAOB) (HATTORI, 2008), quanto a oxidação dos demais ácidos orgânicos e álcoois (BOTELLO SUÁREZ et al., 2018), dependem da transferência de hidrogênio interespecies com captadores de hidrogênio. Esta relação sintrófica pode ser inferida a partir de elevação da abundância relativa de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Tabela 32. Reações sintróficas de oxidação de ácidos e álcoois

Reações	$\Delta G^0$	$\Delta G^{55^\circ\text{C}}$	$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$
HAc a H <sub>2</sub> $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + 4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^-$	+144,4	+92,9	+97,6
HLa a HAc $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$	+35,2	-16,31	-11,6
EtOH a HAc $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+49,6	-1,91	+2,8
HBu a HAc $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+88,2	+36,69	+41,4
1,3-PDO a HAc $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ + 4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$	+82,3	-20,7	-11,3
HPr a HAc $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2 + \text{HCO}_3^-$	+116,4	+64,89	+69,6

Nota: os cálculos de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foram determinados de acordo com os parâmetros descritos por Kleerebezem; Van Loosdrecht, (2010).  $\Delta G^0$ : valores de energia livre de Gibbs em kJ mol<sup>-1</sup> em CNTP;  $\Delta G^{55^\circ\text{C}}$ : valores de energia livre de Gibbs em kJ mol(H<sub>2</sub>)<sup>-1</sup> obedecendo as condição de 55°C, pH 8,2 e pressão de 1 atm;  $\Delta G^{25^\circ\text{C}}$ : valores de energia livre de Gibbs em kJ mol(H<sub>2</sub>)<sup>-1</sup> obedecendo as condição de 25°C, pH 8,2 e pressão de 10<sup>-8</sup> atm.

*Methanotherix*, *Methanothermobacter*, *Methanosarcina* e *Methanoculleus* compuseram 50%, 23%, 4% e 4%, respectivamente, das leituras de gêneros associados ao Domínio Archaea no RALF-ST. No RALF-ST foram identificados *Methanotherix*, *Methanoculleus* e

*Methanosarcina* em abundâncias iguais a 32%, 23% e 12% respectivamente. Dentre estes gêneros, *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* podem ter colaborado para a captação de hidrogênio de ambos os reatores. Além disso, a associação sintrófica entre *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* e SAOB podem ter ocorrido especialmente no RALF-ST. Isto porque *Tepidanaerobacter* representaram 40% dos Firmicutes no RALF-ST. Microrganismos filogeneticamente associadas ao gênero *Tepidanaerobacter* foram previamente isolados e identificados como SAOB (WESTERHOLM et al., 2011) capazes de atuar em relação sintrófica com *Methanoculleus* (MOSBÆK et al., 2016).

Microrganismos filogeneticamente associados a *Methanoculleus* foram previamente identificados em digestão em um reator de segundo estágio alimentado com substrato acidificado (BOTELLO SUÁREZ et al., 2018). Esta ocorrência pode ser associada ao fato de que *Methanoculleus* são hidrogenotróficos e podem usar álcoois como doadores de elétrons (ZHANG et al., 2020a). *Methanoculleus* compuseram 23% das arqueias no RALF-SM e 4% RALF-ST. Por outro lado, *Methanothermobacter* compuseram 23% das arqueias no RALF-ST. Esta ocorrência pode ser explicada pela diferença de temperatura dos reatores, uma vez que, *Methanothermobacter* são favorecidas em temperaturas elevadas (BUITRÓN; MARTÍNEZ-VALDEZ; OJEDA, 2020). Nesse caso, a hipótese é que *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* exerceram a mesma função ecológica em reatores diferentes devido a alimentação com substrato acidificado.

A influência da inserção de substrato acidificado é evidenciada pela diferença da composição microbiana nos RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM. Além disso, a Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinate Analysis* – PCoA) mostra maior similaridade entre as composições dos RALF-ST e RALF-SM do que de ambos os reatores como RALF-MT (Figura 55).

A composição de arqueias dos RALF-ST e RALF-SM em relação ao RALF-MT também se diferenciaram. No RALF-MT foi observada elevada abundância de *Methanothermobacter* (85%). Tal fato foi associado à digestão estável da vinhaça e glicerina adicionada, uma vez que, microrganismos deste gênero são acetoclásticos e requerem condições de baixa concentrações de acetato, baixos choques de pH e temperatura para se desenvolver (DE VRIEZE et al., 2012). Nos RALF-ST e RALF-SM, *Methanothermobacter* compuseram 50% e 32% das arqueias. Nesse caso, a alimentação com efluente contendo maior concentração de ácidos e a necessidade de oxidação desses ácidos fez com que as abundâncias relativas de *Methanothermobacter* fossem inferiores à do RALF-MT.



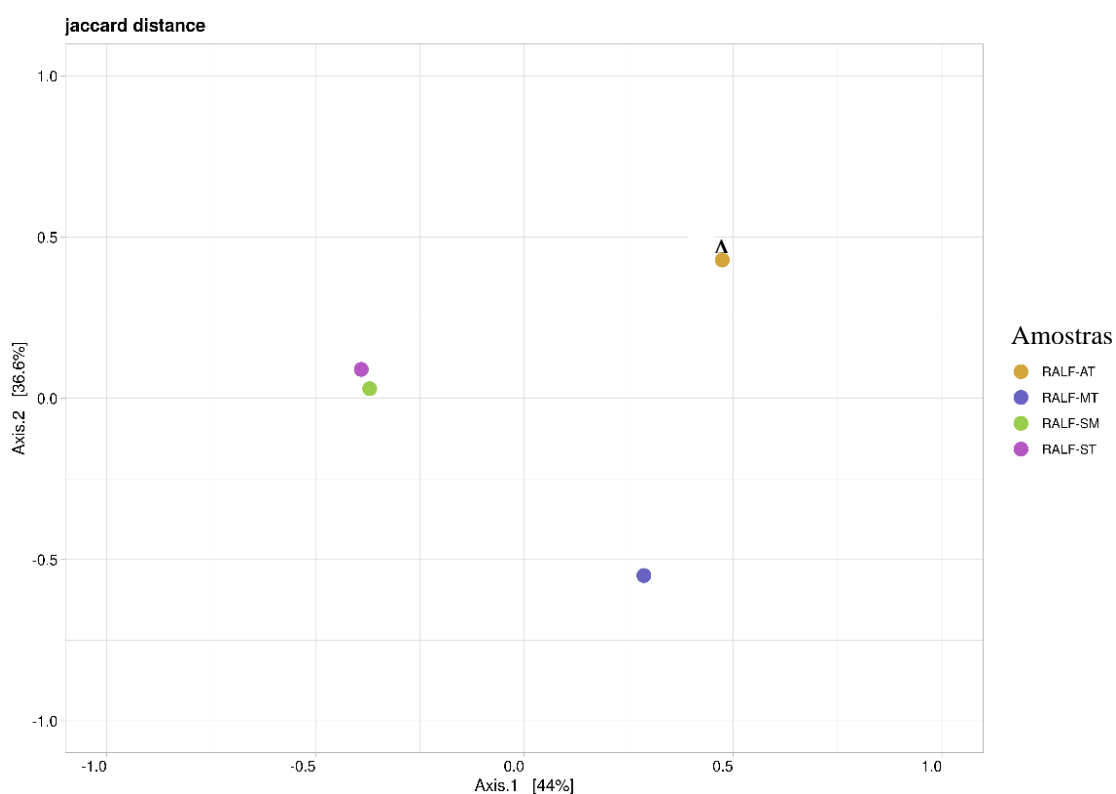


Figura 55. Análise de coordenadas ponderadas principais dos gêneros nos RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$

A maior concentração de ácidos afluente aos RALF-ST e RALF-SM podem também ter influenciado a abundância relativa de *Methanosarcina*. *Methanosarcina* têm maior adaptabilidade a condições adversas do que *Methanothrix* (DE VRIEZE et al., 2012), além de metabolismo mixotrófico, i. e., podem utilizar acetato e  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  como substratos. *Methanosarcina* compuseram 4% das arqueias no RALF-ST e 12% do RALF-SM. A maior abundância relativa de *Methanosarcina* no RALF-SM pode ser justificada pelo maior consumo de substratos e acidogênese neste reator em relação ao RALF-ST. Porém, no geral, o processo de digestão foi estável nos dois reatores. Isto pode ser inferido por meio da relação bem-balanceada entre arqueias acetoclásticas e hidrogenotróficas e pelo elevado consumo de matéria orgânica nos RALF-ST e RALF-SM.

### 5.3.3.1 Distribuição das funções metabólicas nos RALF-ST e RALF-SM

Na Figura 56 estão apresentadas as possíveis rotas de degradação do efluente acidogênico utilizado na alimentação dos RALF-ST e RALF-SM. Os efluentes do reator

hidrogenogênico (RALF-AT) foram compostos em média por: carboidratos totais (365 mg DQO L<sup>-1</sup>), glicerol (3310 mg DQO L<sup>-1</sup>), HLa (139 mg DQO L<sup>-1</sup>), HPr (347 mg DQO L<sup>-1</sup>), HBu (689 mg DQO L<sup>-1</sup>), 1,3-PDO (1951 mg DQO L<sup>-1</sup>), EtOH (139 mg DQO L<sup>-1</sup>), e sulfato (1330 mg DQO L<sup>-1</sup>), que corresponderam a 3%, 37%, 2%, 3%, 8%, 22%, 3% e 15%, respectivamente, da DQO afluente aos RALF-ST e RALF-SM. Os 7% remanescentes corresponderam aos SSV efluentes ao RALF-AT. Na Tabela 33 estão apresentados os genes identificados nas amostras dos RALF-ST e RALF-SM em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Os principais subníveis de Nível 1 do KEGG *database* (Metabolismo) nos RALF-ST e RALF-SM foram metabolismo de carboidratos, metabolismo de lipídios e metabolismo de energia (enxofre e metano), assim como no RALF-MT. Contudo, enquanto 9% do total de KO identificados foram associados à glicólise no RALF-MT, nos RALF-ST e RALF-SM apenas 6,6% das enzimas foram associadas à glicólise em metabolismo de carboidratos (Figura 57). Esse resultado é esperado e pode ser atribuído ao fato de que os RALF-ST e RALF-SM são alimentados com efluente do RALF-AT. Portanto, enquanto a digestão ocorre por completo no RALF-MT, nos RALF-ST e RALF-SM a alimentação com substratos parcialmente hidrolisados e acidificados reduz a necessidade de enzimas que catalisem essas reações. O gene beta-fructofuranosidase (K01193, EC:3.2.1.26) identificado na amostra do RALF-MT, por exemplo, não foi identificado nas amostras dos RALF-ST e RALF-SM, indicando que apesar da concentração de carboidratos totais afluente a esses reatores, a sacarose pode ter sido completamente hidrolisada no RALF-AT.



Tabela 33. Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Glicólise	HK	hexokinase	EC:2.7.1.1	K00844
	glk	glucokinase	EC:2.7.1.2	K00845
	pfkA, PFK	6-phosphofructokinase 1	EC:2.7.1.11	K00850
	GAPDH, gapA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	EC:1.2.1.12	K00134
	PGK, pgk	phosphoglycerate kinase	EC:2.7.2.3	K00927
	gpmI	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15633
	gpmB	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	K15634
	apgM	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	K15635
	PK, pyk	pyruvate kinase	EC:2.7.1.40	K00873
	Piruvato	por, nifJ	pyruvate-ferredoxin/ferredoxin oxidoreductase	EC:1.2.7.1
porA		pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
porB		pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit	EC:1.2.7.1	K00170
porC, porG		pyruvate ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	EC:1.2.7.1	K00172
DLAT, aceF, pdhC		pyruvate dehydrogenase E2 component	EC:2.3.1.12	K00627
DLD, lpd, pdhD		dihydrolipoamide dehydrogenase	EC:1.8.1.4	K00382

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	E2.3.1.8, pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625
	K15024	putative phosphotransacetylase	EC:2.3.1.8	K15024
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	aarC, cat1	succinyl-CoA:acetate CoA-transferase	EC:2.8.3.18	K18118
	ALDH	aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	EC:1.2.1.3	K00128
	ACSS1_2, acs	acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
	ldhA	D-lactate dehydrogenase	EC:1.1.1.28	K03778
	dld	D-lactate dehydrogenase		K18930
	LDH, ldh	L-lactate dehydrogenase	EC:1.1.1.27	K00016
Piruvato	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.2	K00002
	E4.1.1.32, pckA, PCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	EC:4.1.1.32	K01596
	E4.1.1.49, pckA	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	EC:4.1.1.49	K01610
	pps, ppsA	pyruvate, water dikinase	EC:2.7.9.2	K01007
	ppdK	pyruvate, orthophosphate dikinase	EC:2.7.9.1	K01006
	PC, pyc	pyruvate carboxylase	EC:6.4.1.1	K01958
	oadA	oxaloacetate decarboxylase (Na <sup>+</sup> extruding) subunit alpha	EC:7.2.4.2	K01571
	pct	propionate CoA-transferase	EC:2.8.3.1	K01026

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Piruvato	pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K13788
	E2.3.1.54, pflD	formate C-acetyltransferase	EC:2.3.1.54	K00656
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	ALDH	aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	EC:1.2.1.3	K00128
	E1.1.1.1, adh	alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.1	K00001
	adhP	alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	EC:1.1.1.1	K13953
	viaY	alcohol dehydrogenase	EC:1.1.1.1	K13954
Glicerol	ALDH	aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	EC:1.2.1.3	K00128
	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.2	K00002
	dhaT	1,3-propanediol dehydrogenase	EC:1.1.1.202	K00086
	gldA	glycerol dehydrogenase	EC:1.1.1.6	K00005
	DAK, TKFC	triose/dihydroxyacetone kinase / FAD-AMP lyase (cyclizing)	EC:2.7.1.28 2.7.1.29 4.6.1.15	K00863
	dhaK	phosphoenolpyruvate---glycerone phosphotransferase subunit DhaK	EC:2.7.1.121	K05878
	AKR1A1, adh	alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> )	EC:1.1.1.2	K00002
	ALDH	aldehyde dehydrogenase (NAD <sup>+</sup> )	EC:1.2.1.3	K00128
	glxK, garK	glycerate 2-kinase	EC:2.7.1.165	K00865

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	porB	pyruvate ferredoxin oxidoreductase beta subunit	EC:1.2.7.1	K00170
	porC, porG	pyruvate ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	EC:1.2.7.1	K00172
	E2.3.1.8, pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625
	K15024	putative phosphotransacetylase	EC:2.3.1.8	K15024
	ackA	acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
	ACSS1_2, acs	acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
	LDH, ldh	L-lactate dehydrogenase	EC:1.1.1.27	K00016
	pct	propionate CoA-transferase	EC:2.8.3.1	K01026
Propionato	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	mmsA, iolA, ALDH6A1	malonate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating) / methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.18 1.2.1.27	K00140
	PCCB, pccB	propionyl-CoA carboxylase beta chain	EC:6.4.1.3 2.1.3.15	K01966
	pccB	acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit	EC:6.4.1.2 6.4.1.3 2.1.3.15	K19312
	MCEE, epi	methylmalonyl-CoA/ethylmalonyl-CoA epimerase	EC:5.1.99.1	K05606
	MUT	methylmalonyl-CoA mutase	EC:5.4.99.2	K01847
	E5.4.99.2A, mcmA1	methylmalonyl-CoA mutase, N-terminal domain	EC:5.4.99.2	K01848

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Propionato	E5.4.99.2B, mcmA2	methylmalonyl-CoA mutase, C-terminal domain	EC:5.4.99.2	K01849
	ACSS3, prpE	propionyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.17	K01908
	pta	phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K13788
	E2.3.1.54, pflD	formate C-acetyltransferase	EC:2.3.1.54	K00656
	porA	pyruvate ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	EC:1.2.7.1	K00169
	paaF, echA	enoyl-CoA hydratase	EC:4.2.1.17	K01692
	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	BCKDHB, bkdA2	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component beta subunit	EC:1.2.4.4	K00167
	bkdA	2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component	EC:1.2.4.4	K11381
	DLD, lpd, pdhD	dihydrolipoamide dehydrogenase	EC:1.8.1.4	K00382
HBu	ACADS, bcd	butyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.8.1	K00248
	phbC, phaC	polyhydroxyalkanoate synthase subunit PhaC	EC:2.3.1.-	K03821
	croR	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	EC:4.2.1.55	K17865
	paaH, hbd, fadB, mmgB	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	EC:1.1.1.157	K00074
	paaF, echA	enoyl-CoA hydratase	EC:4.2.1.17	K01692
	ptb	phosphate butyryltransferase	EC:2.3.1.19	K00634



Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
HBu	buk	butyrate kinase	EC:2.7.2.7	K00929
	atoD	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit	EC:2.8.3.8 2.8.3.9	K01034
	ACAT, atoB	acetyl-CoA C-acetyltransferase	EC:2.3.1.9	K00626
Sulfato	sat, met3	sulfate adenylyltransferase	EC:2.7.7.4	K00958
	cysC	adenylylsulfate kinase	EC:2.7.1.25	K00860
	cysD	sulfate adenylyltransferase subunit 2	EC:2.7.7.4	K00957
	cysH	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	EC:1.8.4.8 1.8.4.10	K00390
	cysJ	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component	EC:1.8.1.2	K00380
	cysI	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component	EC:1.8.1.2	K00381
	cysN	sulfate adenylyltransferase subunit 1	EC:2.7.7.4	K00956
	aprA	adenylylsulfate reductase, subunit A	EC:1.8.99.2	K00394
	aprB	adenylylsulfate reductase, subunit B	EC:1.8.99.2	K00395
	dsrA	dissimilatory sulfite reductase alpha subunit	EC:1.8.99.5	K11180
dBRS	dissimilatory sulfite reductase beta subunit	EC:1.8.99.5	K11181	
Hidrogênio	E1.12.7.2L	ferredoxin hydrogenase large subunit	EC:1.12.7.2	K00533
	E1.12.7.2S	ferredoxin hydrogenase small subunit	EC:1.12.7.2	K00534
	mbhJ	membrane-bound hydrogenase subunit mbhJ	EC:1.12.7.2	K18023
	fhs	formate--tetrahydrofolate ligase	EC:6.3.4.3	K01938

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
Hidrogênio	MTHFD	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase / formyltetrahydrofolate synthetase	EC:1.5.1.5 3.5.4.9 6.3.4.	K00288
	folD	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	EC:1.5.1.5 3.5.4.9	K01491
	metF, MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)	EC:1.5.1.20	K00297
	acsE	5-methyltetrahydrofolate corrinoid/iron sulfur protein methyltransferase	EC:2.1.1.258	K15023
	acsB	acetyl-CoA synthase	EC:2.3.1.169	K14138
	Metano	cdhA	anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase, CODH/ACS complex subunit alpha	EC:1.2.7.4
cdhC		acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit beta	EC:2.3.1.169	K00193
cdhE, acsC		acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit gamma	EC:2.1.1.245	K00197
E2.3.1.8, pta		phosphate acetyltransferase	EC:2.3.1.8	K00625
ackA		acetate kinase	EC:2.7.2.1	K00925
ACSS1_2, acs		acetyl-CoA synthetase	EC:6.2.1.1	K01895
frhB		coenzyme F420 hydrogenase subunit beta	EC:1.12.98.1	K00441
fdoG, fdhF, fdwA		formate dehydrogenase major subunit	EC:1.17.1.9	K00123

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	cooS, acsA	anaerobic carbon-monoxide dehydrogenase catalytic subunit	EC:1.2.7.4	K00198
	fdhF	formate dehydrogenase (hydrogenase)	EC:1.17.98.4	K22015
	fdhA	formate dehydrogenase (NADP+) alpha subunit	EC:1.17.1.10	K05299
	mtaB	methanol---5-hydroxybenzimidazolylcobamide Co-methyltransferase	EC:2.1.1.90	K04480
	mcrG	methyl-coenzyme M reductase gamma subunit	EC:2.8.4.1	K00402
	hdrA2	heterodisulfide reductase subunit A2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8.98.5 1.8.98.6	K03388
	hdrC2	heterodisulfide reductase subunit C2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8.98.5 1.8.98.6	K03390
Metano	mvhD, vhuD, vhcD	F420-non-reducing hydrogenase iron-sulfur subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5 1.8.98.6	K14127
	mvhA, vhuA, vhcA	F420-non-reducing hydrogenase large subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5	K14126
	fdhB	formate dehydrogenase (coenzyme F420) beta subunit	EC:1.17.98.3 1.8.98.6	K00125
	cdhE, acsC	acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit gamma	EC:2.1.1.245	K00197
	cdhD, acsD	acetyl-CoA decarbonylase/synthase, CODH/ACS complex subunit delta	EC:2.1.1.245	K00194
	mtrA	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit A	EC:2.1.1.86	K00577
	mtrC	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit C	EC:2.1.1.86	K00579

Tabela 33. (cont.) Identificação de genes associados a cada estágio de degradação da vinhaça e do glicerol previamente acidificados em reator hidrogenogênico (RALF-AT)

<b>Etapa/Metabolismo</b>	<b>Gene</b>	<b>Enzima</b>	<b>EC</b>	<b>Kegg</b>
	mtrD	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit D	EC:2.1.1.86	K00580
	mtrE	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit E	EC:2.1.1.86	K00581
	mtrH	tetrahydromethanopterin S-methyltransferase subunit H	EC:2.1.1.86	K00584
	mcrA	methyl-coenzyme M reductase alpha subunit	EC:2.8.4.1	K00399
	mcrB	methyl-coenzyme M reductase beta subunit	EC:2.8.4.1	K00401
	mcrG	methyl-coenzyme M reductase gamma subunit	EC:2.8.4.1	K00402
	hdrC2	heterodisulfide reductase subunit C2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8.98.5 1.8.98.6	K03390
Metano	hdrB2	heterodisulfide reductase subunit B2	EC:1.8.7.3 1.8.98.4 1.8.98.5 1.8.98.6	K03389
	hdrD	heterodisulfide reductase subunit D	EC:1.8.98.1	K08264
	mvhD, vhuD, vhcD	F420-non-reducing hydrogenase iron-sulfur subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5 1.8.98.6	K14127
	mvhA, vhuA, vhcA	F420-non-reducing hydrogenase large subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5	K14126
	mvhG, vhuG, vhcG	F420-non-reducing hydrogenase small subunit	EC:1.12.99.- 1.8.98.5	K14128

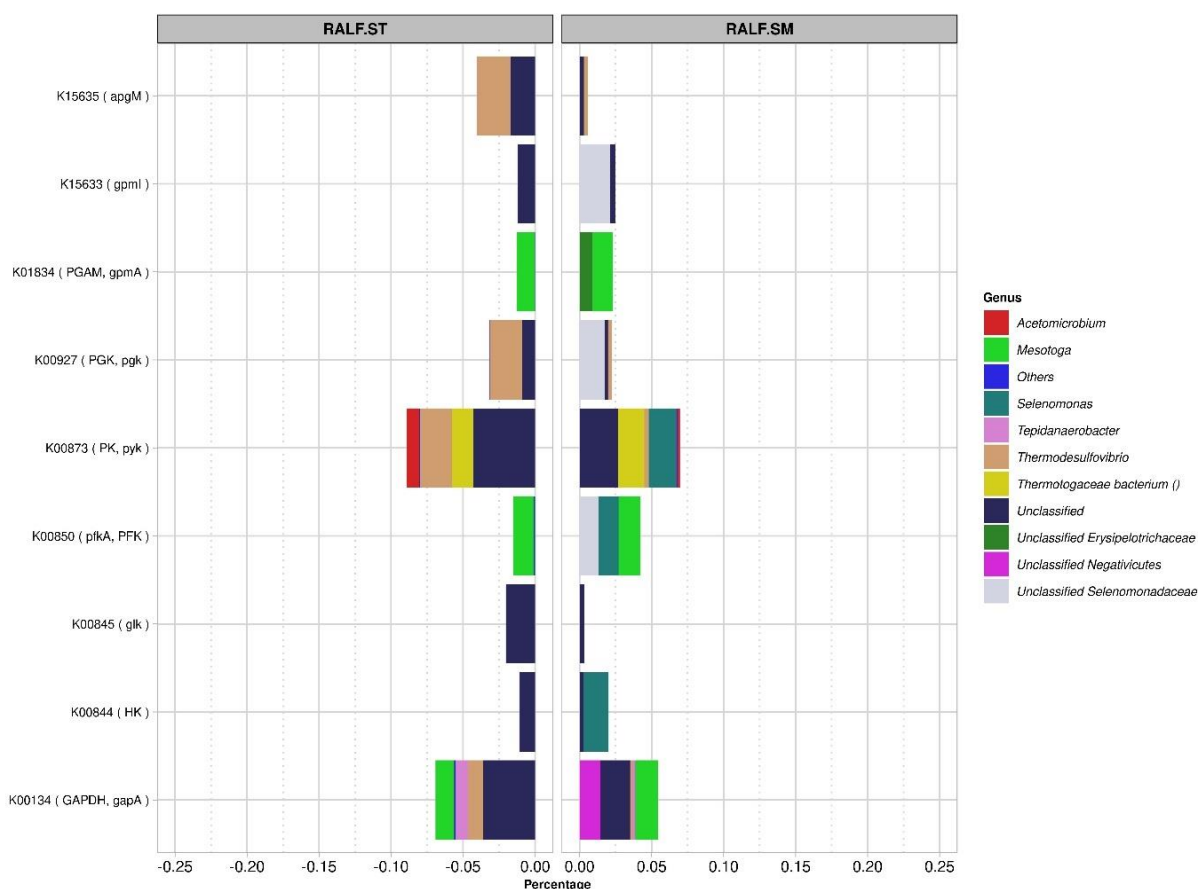


Figura 57. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na etapa de glicólise dos RALF-ST e RALF-SM

Os KO mais abundantes no subnível glicólise em ambos os reatores foram K00873 e K00134. A elevada abundância do KO relacionado ao gene que codifica a enzima pyruvate kinase (K00873, EC:2.7.1.40), em relação aos demais KO do subnível glicólise (Figura 57), é justificada pelo fato de que a pyruvate kinase conecta os subníveis de glicólise e metabolismo do piruvato pois catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato a piruvato. No RALF-ST esta enzima pode ser associada aos metabolismos de *Thermodesulfovibrio* e *Acetomicrobium*. Por outro lado, no RALF-SM esta enzima pode ser relacionada ao metabolismo de *Selenomonas*, assim como no RALF-MT. Por sua vez, a maior abundância do KO relacionado ao gene que codifica a enzima glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (K00134, EC:1.2.1.12) (Figura 57) é relacionada à conexão dos metabolismos de glicose e glicerol. A atividade da enzima glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, assim como as atividades de glycerol kinase (EC:2.7.1.30) e triosefosfato isomerase (EC:5.3.1.1), são requeridas para conversão de glicerol

a glyceraldehyde 3-phosphate, que é o intermediário em comum das vias de degradação de glicerol (Figura 58) e carboidratos (NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012).

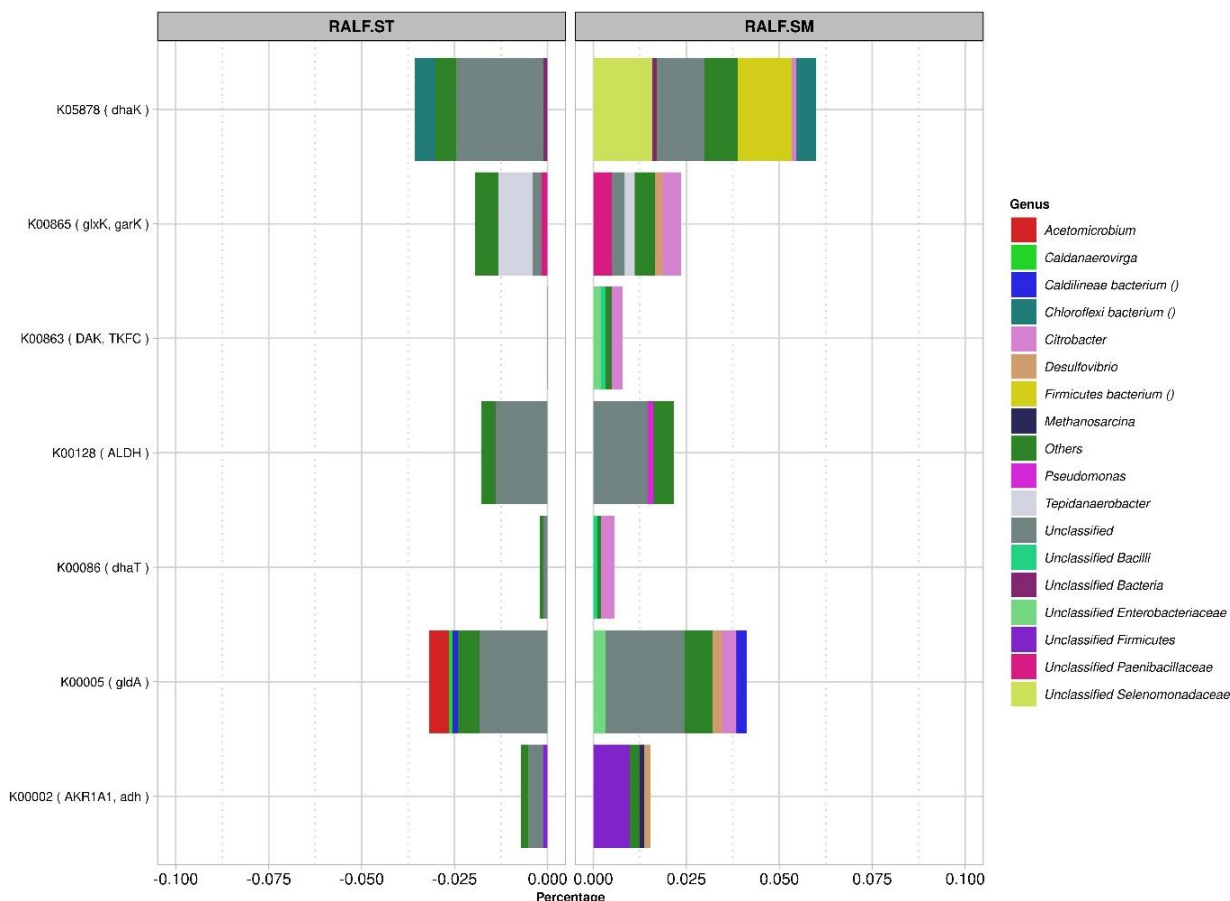


Figura 58. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de glicerol nos RALF-ST e RALF-SM

Os KO identificados em maior percentual relativo na via de degradação do glicerol (Figura 58) nos RALF-ST e RALF-SM foram os associados aos genes phosphoenolpyruvate--glycerone phosphotransferase subunit DhaK (EC:2.7.1.121, K05878) e glycerol dehydrogenase (EC:1.1.1.6, K00005). Isto indica que o glicerol pode ter sido oxidado preferencialmente a glicerona (dihidroxiacetona) e fosforilado a fosfato de glicerona (fosfato de dihidroxiacetona) e não a D-gliceraldeído porque KO associados a EC:1.1.1.72 não foram identificados. Os KO associados a genes que codificam a enzima glycerol dehydratase large subunit (EC:4.2.1.30, K06120) também não foram identificados nas amostras dos RALF-ST e RALF-SM. No caso da dismutação do glicerol pela via oxidativa, a ausência de enzimas para oxidação de glicerol em D-gliceraldeído pode ser justificada por fosfato de di-hidroxiacetona

entrar diretamente na via de glicólise (NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012). Por outro lado, a ausência de enzima para metabolização de glicerol em 3-hidroxi-propanal indica que não ocorreu dismutação do glicerol por via redutiva. Nesse caso, a identificação de genes associados a enzima 1,3-propanediol dehydrogenase (EC:1.1.1.202, K00086) podem não estar ligados à síntese de 1,3-propanodiol, mas sim à degradação (Figura 59).

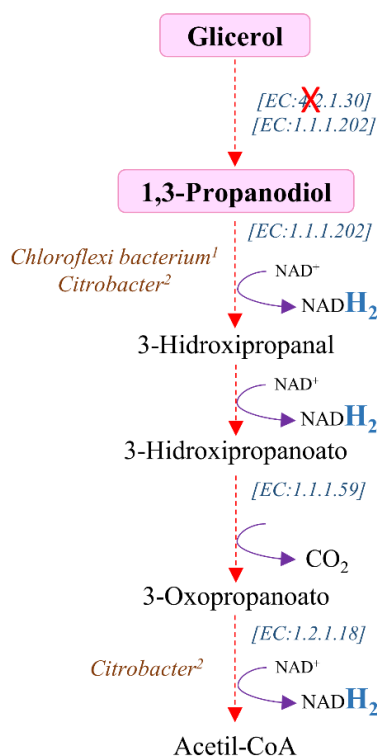


Figura 59. Detalhamento das enzimas envolvidas na possível rota de degradação de 1,3-propanodiol nos RALF-ST e RALF-SM. Os números entre colchetes são os códigos das enzimas; <sup>1</sup>: principais gêneros associados ao gene da enzima no RALF-ST; <sup>2</sup>: principais gêneros associados ao gene da enzima no RALF-SM

Oppenberg e Schink (1990) apontaram que a degradação do 1,3-propanodiol não é uma reação reversa à síntese deste álcool e que aldehyde dehydrogenase, phosphate acetyltransferase e acetate kinase desempenham papel central nesta via. Os genes que codificam as enzimas phosphate acetyltransferase (EC:2.3.1.8, K00625) e acetate kinase (EC:2.7.2.1, K00925) foram identificados nos RALF-ST e RALF-SM. A identificação destes genes pode tanto indicar que ocorreu conversão de acetil-CoA em acetil-P e acetil-P em acetato, quanto indicar metabolização do propionato. De fato, Hansen (1994) relatou que o 1,3-PDO pode ser oxidado diretamente a acetato e a 3-hidroxi-propanoato (metabolismo do HPr) a depender da cepa. Então, nos RALF-ST e RALF-SM as duas vias de degradação de 1,3-PDO são possíveis porque genes

de enzimas que catalisam a conversão de 3-hidroxiopropanoato a acetil-CoA foram identificados (Figura 59). Além disso, microrganismos do gênero *Desulfovibrio*, associados à degradação de 1,3-PDO em 3-hidroxiopropanoato (OPPENBERG; SCHINK, 1990), foram detectados nas amostras de ambos os reatores e o sulfato pode ter sido o principal acceptor de elétrons (HANSEN, 1994).

A remoção completa do sulfato ( $1227 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ) foi negativamente associada à divergência entre os valores de MY nos RALF-ST e RALF-SM ( $266 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$  e  $324 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ , respectivamente) e o MY teórico ( $350 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$ ). Por outro lado, a redução de sulfato foi positivamente associada à baixa necessidade de adição externa de alcalinidade aos reatores e às degradações de 1,3-PDO e HPr, uma vez que, essas reações não são exergônicas no RALF-SM e a degradação de HPr não é exergônica no RALF-ST (Tabela 32). A redução de sulfato no RALF-ST foi associada principalmente ao metabolismo de *Thermodesulfovibrio*. Já no RALF-SM a redução de sulfato foi associada ao metabolismo de *Desulfovibrio*. A caracterização funcional corrobora a discussão acerca da caracterização taxonômica nos reatores. Os KO de genes associados ao metabolismo dissimilatório do sulfato foram identificados em maior porcentagem em ambos os reatores: sulfite adenylyltransferase (EC:2.7.7.4, K00958), adenylylsulfate reductase, subunit A (EC:1.8.99.2, K00394), dissimilatory sulfite reductase alpha subunit (EC:1.8.99.5, K11180), dissimilatory sulfite reductase beta subunit (EC:1.8.99.5, K11181). Enquanto no RALF-ST estes KO podem ser relacionados a *Candidatus Desulfuridis* e *Thermodesulfovibrio*, no RALF-SM podem ser relacionados a *Desulfovibrio* e *Deltaproteobacteria bacterium*.

Os KO associados ao metabolismo do HPr (Figura 60) foram detectados em maiores proporções nos RALF-ST e RALF-SM em relação aos associados ao metabolismo de HBU (Tabela 33). Isto pode ter ocorrido porque o HPr foi adicionado aos reatores ( $229 \text{ mg L}^{-1}$ ), oriundo do efluente do RALF-AT, e a síntese de HPr em reatores alimentados com glicerol como cossustrato também é relatada (FERREIRA; VOLSCHAN; CAMMAROTA, 2018; SITTIJUNDA et al., 2021). Adicionalmente, o HLa adicionado ( $130 \text{ mg L}^{-1}$ ) pode também ter sido degradado por enzimas que conectam os metabolismos de HLa e HPr, ocasionando aumento da porcentagem de KO relacionados. Os genes associados a propionate CoA-transferase (EC:2.8.3.1, K01026) e lactoyl-CoA dehydratase subunit alpha (EC:4.2.1.54, K20626) sugerem metabolização do HLa a lactoil-CoA e posteriormente a acriloil-CoA. O gene butyryl-CoA dehydrogenase compõe a rota Malonate semialdehyde (propanoil-CoA => acetil-CoA) e catalisa a conversão de propanoil-CoA em acriloil-CoA, conectando a degradação de HLa e HPr. A atividade desses genes pode ser deduzida a partir da ausência de HLa no efluente



dos reatores e ausência de HPr no efluente do RALF-ST e a baixa concentração de HPr no efluente do RALF-SM (7,5 mg L<sup>-1</sup>).

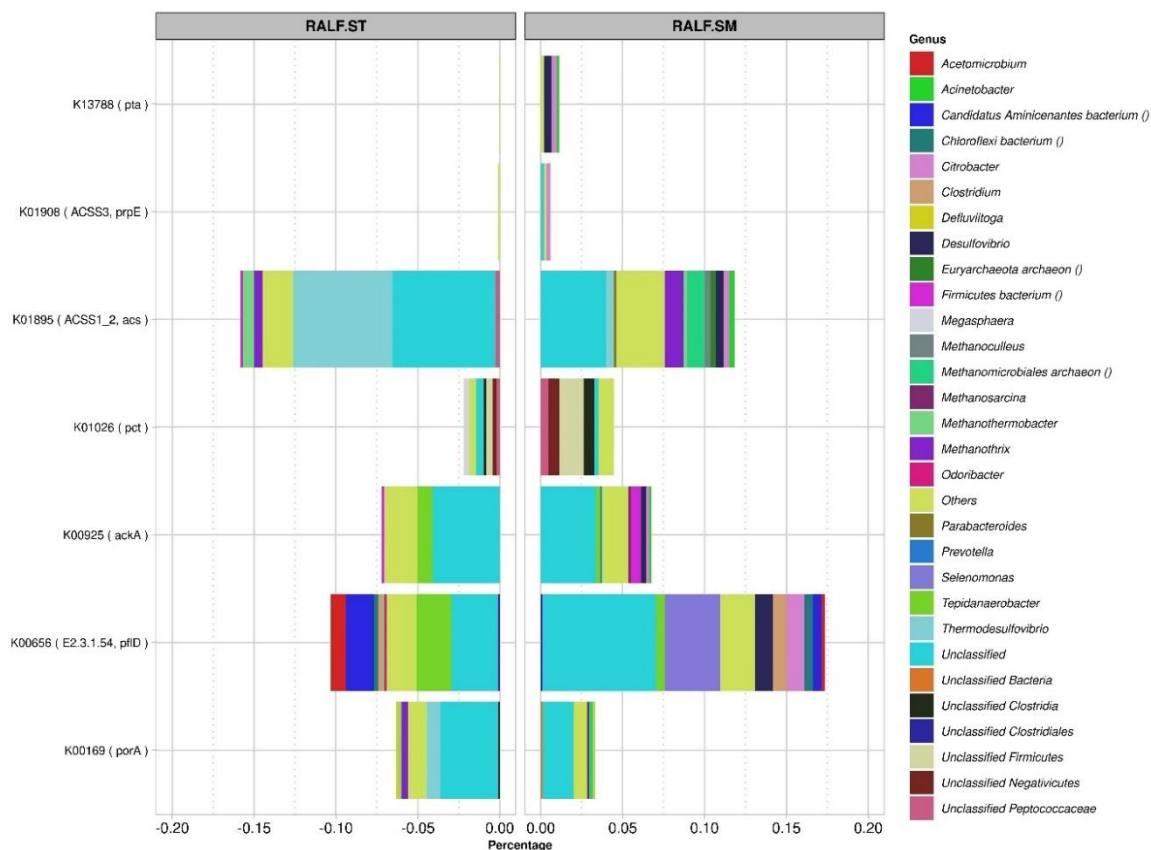


Figura 60. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados na degradação de propionato nos RALF-ST e RALF-SM

A taxa de degradação de HPr é exponencialmente aumentada pela presença de sulfato nos reatores (QATIBI; BORIES; GARCIA, 1990) e, como já foi previamente discutido, isso pode ter sido um motivo para que não ocorresse acúmulo deste metabólito nos RALF-ST e RALF-SM. Este comportamento difere-se da mono-digestão de glicerol, em que, baixas TCO como acarretam acúmulo de HPr (T.B. COSTA et al., 2021) e predominância de arqueias hidrogenotróficas (DINH et al., 2014). A predominância de arqueias hidrogenotróficas ocorre porque a oxidação de HPr em acetato e H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> é realizada por bactérias oxidadoras de HPr que se estabelecem em co-cultura com estas arqueias (LI et al., 2012). As arqueias hidrogenotróficas foram identificadas nos RALF-ST (23% *Methanothermobacter*, 4% *Methanoculleus*) e RALF-SM (23% *Methanoculleus*). Porém, a abundância relativa de KO de genes associados a metanogênese hidrogenotrófica (EC:1.2.7.12 e EC:1.17.98.3 1.8.98.6) foram menos abundantes em relação aos de metanogênese acetoclástica em ambos os reatores (Figura 61). A

maior abundância relativa de *Methanotherix* nos RALF-ST (50% das arqueias) e RALF-SM (32%) também pode ser explicada pela sulfetogênese, que aumenta a ocorrência de metanogênese acetoclástica (LU et al., 2016). De fato, o gene que codifica a enzima acetyl-CoA synthetase (K01895, EC:6.2.1.1) foi o mais abundante e foi associado aos metabolismos, dentre outros, de *Thermodesulfobrio* no RALF-ST e *Desulfovíbrio* no RALF-SM e *Methanotherix* em ambos os reatores.

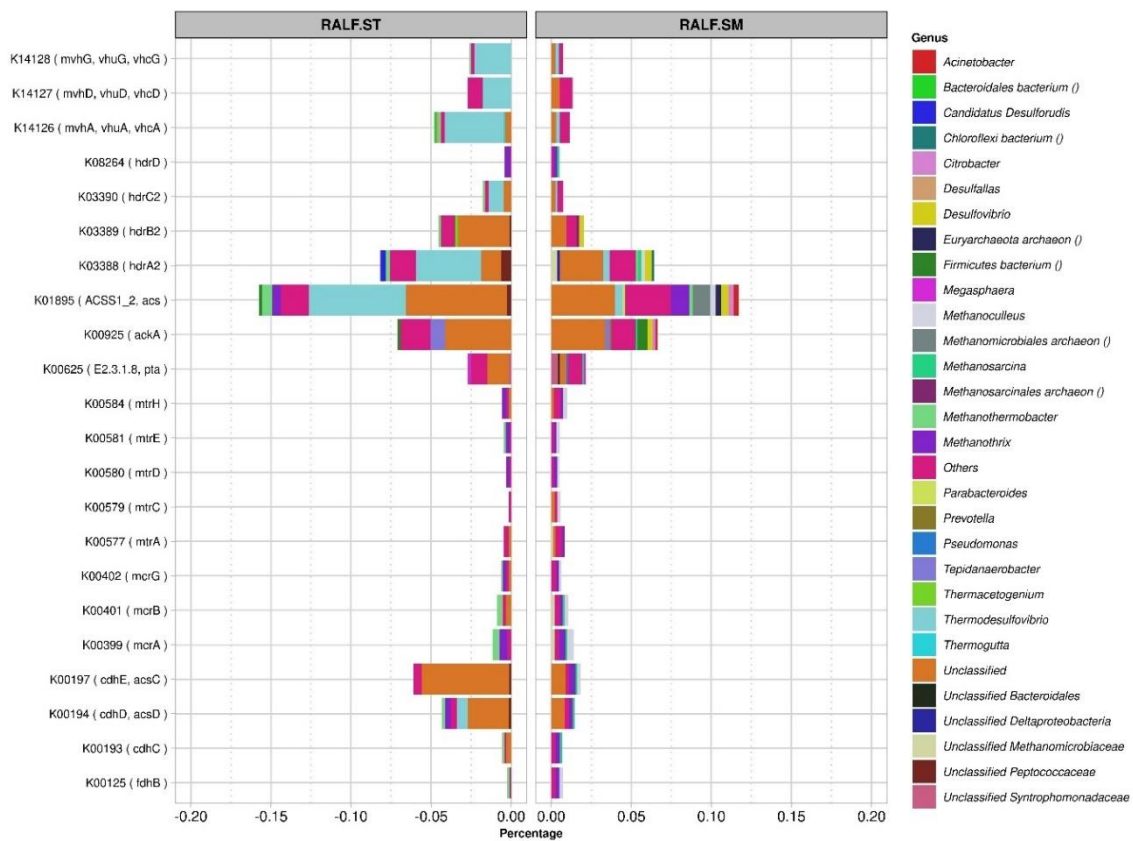


Figura 61. Atribuição de taxonomia a partir dos genes encontrados e associados a metanogênese nos RALF-ST e RALF-SM

### 5.3.4 Comparação entre a digestão em um e dois estágios

A comparação do efeito do aumento de TCO na digestão de vinhaça e glicerina em um estágio e dois estágios, assim como a digestão em dois estágios termofílica – termofílica e termofílica – mesofílica, foi realizada por do modelo *Stover-Kincannon* modificado e de Análise de Variância (ANOVA) de fator único dos dados.

#### 5.3.4.1 *Stover-Kincannon*

Na Figura 62 estão apresentados os dados de linearização das TCOs aplicadas em função das TCOs removidas em estado estacionário nos RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM de acordo com o modelo *Stover-Kincannon* (veja item 4.7).

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para os dados dos RALF-MT (0,9838), RALF-ST (0,9988) e RALF-SM (0,9964) são similares aos observados na aplicação deste modelo para ajuste dos dados de digestão de resíduos sólidos municipais (0,995) (T.A.S et al., 2020), lodo de esgoto + vinhaça (0,997) (TENA; PEREZ; SOLERA, 2021b), água residuária de abatedouro de aves (0,992) (NJOYA et al., 2021) e glicerina (0,9927) (T.B. COSTA et al., 2021). Elevados valores de coeficientes de determinação da co-digestão de vinhaça e glicerol apontam que houve ajuste do modelo aos dados experimentais. O menor valor de coeficiente de determinação do RALF-MT em relação aos RALF-ST e RALF-SM indica que este foi mais afetado pela variação da composição da vinhaça. Esse resultado é esperado e mostra que o reator acidogênico amorteceu os efeitos da variabilidade da vinhaça nos reatores metanogênicos em dois estágios. De fato, ao excluir do modelo a condição operacional com maior variação da qualidade da vinhaça ( $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) é possível observar aumento do coeficiente de determinação no RALF-MT para 0,9991.

Os valores da constante de taxa de utilização máxima de substrato ( $U_{máx}$ ) foram de  $73,5 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $588,2 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $128,2 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para os RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM. Os valores da constante de saturação ( $K_B$ ) para esses reatores foram de  $75,2 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $668,4 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $136,8 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para os RALF-MT, RALF-ST e RALF-SM, respectivamente.

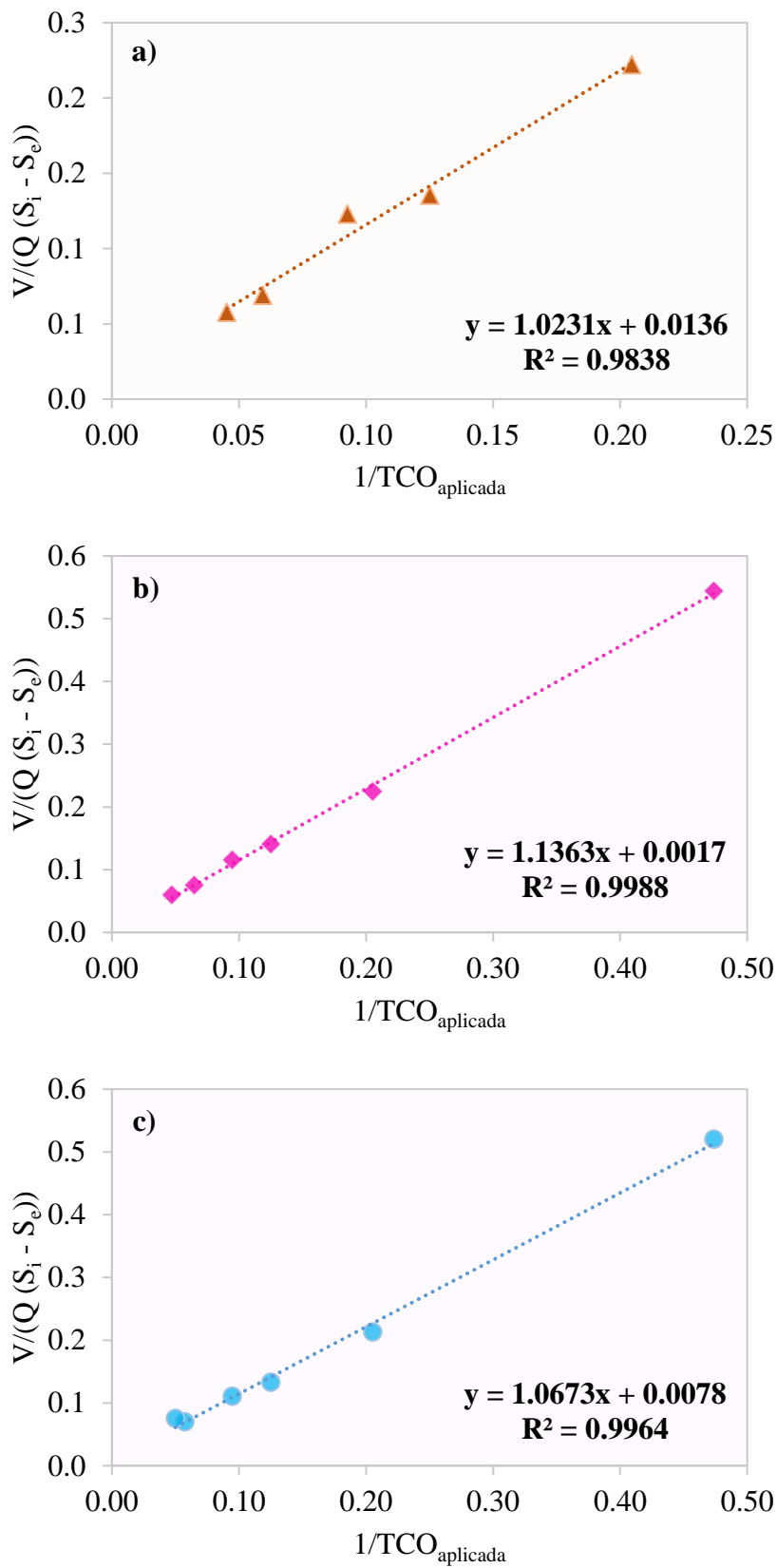


Figura 62. Ajuste linear do modelo *Stover–Kincannon* modificado aplicado aos dados em estado estacionário dos RALF-MT (a), RALF-ST (b) e RALF-SM (c)

A performance da co-digestão termofílica de vinhaça quanto à utilização de substrato ( $U_{máx}$  de 73,5 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e  $K_B$  de 75,2 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi superior às observadas em co-digestão de vinhaça e lodo de esgoto ( $U_{máx}$  de 172,4 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e  $K_B$  de 208,7 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (TENA; PEREZ; SOLERA, 2021b) e mono-digestão termofílica de glicerol ( $U_{máx}$  de 23,1 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e  $K_B$  de 23,8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (T.B. COSTA et al., 2021). Portanto, a co-digestão de vinhaça e glicerol proporcionou condições ideais para remoção de matéria orgânica mesmo em TCO tão elevada quanto 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Por outro lado, a digestão em dois estágios termofílica - termofílica e termofílica - mesofílica superou a digestão em um estágio em relação a remoção de matéria orgânica. A combinação em dois estágios termofílico - termofílico levou a valores de  $U_{máx}$  de 588,2 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e  $K_B$  de 668,4 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, i. e., significativamente superiores aos observados na combinação termofílico - mesofílico. T.B. Costa et al. (2021) também observaram que o RALF termofílico apresentou indicadores mais satisfatórios ( $U_{máx}$  de 23,1 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e  $K_B$  de 23,8 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) do que o RALF mesofílico ( $U_{máx}$  de 6,6 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e  $K_B$  de 7,1 g DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Assim como no presente estudo, os autores confirmaram a melhor performance do RALF termofílico pela falha do RALF mesofílico em TCO mais elevadas.

#### 5.3.4.2 Análise estatística

Na Tabela 34 está apresentada a comparação dos dados em estado estacionário de eficiência de remoção de matéria orgânica,  $PVM_{leito}$  e MY de co-digestão de vinhaça e glicerina em estágio único (RALF-MT) e em dois estágios termofílico – termofílico (RALF-ST) e termofílico – mesofílico (RALF-SM). Por meio de ANOVA não foi possível observar variação significativa dos valores de eficiência de remoção de matéria orgânica em função das TCOs aplicadas em cada reator. No RALF-ST o valor de F (0,11692) foi inferior a  $F_{crítico}$  (2,437693) para os dados de 2 a 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. O valor de F (0,649511) também foi inferior a  $F_{crítico}$  (2,4771) para os dados de 2 a 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> no RALF-SM, assim como no RALF-MT (0,36144 < 1,718165). A comparação dos valores de eficiência de remoção de matéria orgânica de todos os reatores condições aplicadas sugerem que a remoção de matéria orgânica não foi influenciada pelo tipo de tratamento (um ou dois estágios), pela temperatura de operação e pela TCO, visto que,  $F$  (0,2937) <  $F_{crítico}$  (1,718165) e valor-P (0,997) > 0,05.

A aplicação de ANOVA aos dados de MY do RALF-SM em todas as TCO indicam que este parâmetro foi significativo:  $F$  (4,203374) >  $F_{crítico}$  (2,477169). Ao aplicar ANOVA aos dados em estado estacionário das TCOs de 5 a 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> não foi observada influência

da TCO no MY. Similarmente, a aplicação de ANOVA aos dados dos RALF-ST, RALF-SM e RALF-MT (5 a 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) simultaneamente indicou que o MY não foi influenciado pelo aumento da TCO –  $F(0,157019) < F_{\text{crítico}}(1,803206)$  e valor-P (0,99979) > 0,05.

Tabela 34. Médias dos dados de remoção de matéria orgânica, PVM e MY em estado estacionário

TCO		RALF-A + RALF-ST	RALF-A + RALF-SM	RALF-M
2	DQO <sup>a</sup>	93	97	79
	PVM <sup>b</sup>	0,95	0,37	0,94
	MY <sup>c</sup>	184	77	170
5	DQO <sup>a</sup>	97	99	92
	PVM <sup>b</sup>	3,49	3,19	3,62
	MY <sup>c</sup>	300	286	264
7,5	DQO <sup>a</sup>	95	99	92
	PVM <sup>b</sup>	4,32	4,00	4,41
	MY <sup>c</sup>	258	264	265
10	DQO <sup>a</sup>	88	91	76
	PVM <sup>b</sup>	4,36	4,79	4,89
	MY <sup>c</sup>	266	324	279
15	DQO <sup>a</sup>	86	80	86
	PVM <sup>b</sup>	8,04	8,18	7,24
	MY <sup>c</sup>	286	269	269
20	DQO <sup>a</sup>	81	70	79
	PVM <sup>b</sup>	8,55	6,32	8,83
	MY <sup>c</sup>	270	269	260

<sup>a</sup>: eficiência de remoção de DQO (%); <sup>b</sup>: PVM<sub>leito</sub> em L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>: MY em mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>

## 5.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA CO-DIGESTÃO DE VINHAÇA E GLICERINA

Uma etapa adicional de avaliação do efeito do aumento da temperatura de 55 °C para 60 °C e 65 °C nos RALF-MT, RALF-AT e RALF-ST foi efetuada para a proporção de vinhaça e glicerina igual a 50%: 50% em base DQO e concentração afluyente fixa de 10 g DQO L<sup>-1</sup>. Silva et al. (2021) reportaram recentemente que o aumento da temperatura de 55 °C para 65 °C na fermentação de vinhaça e glicerina como cossustratos foi capaz de reduzir a variabilidade de metabólitos nas amostras de efluente. O Y<sub>1,3-PDO</sub> reportado pelos autores em 65 °C foi de 0,89 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol, próximo ao teórico (1 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol). Este achado é interessante do ponto de vista de extração de metabólitos líquidos após a etapa de acidogênese. No entanto, Niz et al. (2021) relataram que o aumento da temperatura para valores na faixa hipertermofílica (70 °C) foi prejudicial à produção de metano a partir de vinhaça em um e dois estágios. Então, nesta etapa adicional foi verificado se a co-digestão de vinhaça e glicerina em diferentes combinações de temperatura, especialmente as na faixa hipertermofílica, apresentaria efeito deletério à produção de metano em um e dois estágios.

### 5.4.1 Efeito do aumento da temperatura no desempenho do RALF-AT

O aumento na temperatura operacional de 55 °C para 60 °C com concentração total de glicerol e vinhaça fixa em 10 g DQO L<sup>-1</sup> e TDH de 4 h resultou em menores eficiências de conversão de carboidratos (de 40,3% a 17,2%) e glicerol (de 54,3% a 35,2%) no RALF-AT (Tabela 35, Figura 63). O posterior aumento da temperatura para 65 °C causou uma redução na eficiência de conversão de carboidratos para 11,9% (carboidrato), enquanto a conversão de glicerol permaneceu estável (Figura 63). Por outro lado, ao observar a concentração de carboidratos convertida em cada condição operacional (131 mg L<sup>-1</sup> em 55 °C, 136 mg L<sup>-1</sup> em 60 °C e 117 mg L<sup>-1</sup> em 65 °C) é possível inferir que a conversão de componentes da vinhaça foi praticamente desprezível em todas as temperaturas. A impressão de maiores conversões de carboidratos da vinhaça em 55 °C vem da menor concentração de carboidratos afluyente do lote de vinhaça utilizado nesta condição operacional (Tabela 9). Em contrapartida, apesar da maior disponibilidade de carboidratos na alimentação do RALF-AT em 60 °C e 65 °C, o glicerol se manteve como substrato preferencial dos microrganismos.

Tabela 35. Concentrações afluente e efluente de carboidratos totais e glicerina em função da temperatura de operação aplicada ao RALF-AT

Etapa	Temperatura (°C)	C <sub>aflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>eflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Glic <sub>aflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Glic <sub>eflu</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
1	55	456 ± 165	325 ± 117	5428 ± 727	2481 ± 332
4	60	788 ± 55	652 ± 67	6177 ± 742	4047 ± 935
5	65	1052 ± 182	935 ± 204	5964 ± 200	4419 ± 255

C<sub>aflu/eflu</sub>: concentração de carboidratos afluente/efluente; Glic<sub>aflu/eflu</sub>: concentração de glicerol afluente/efluente.

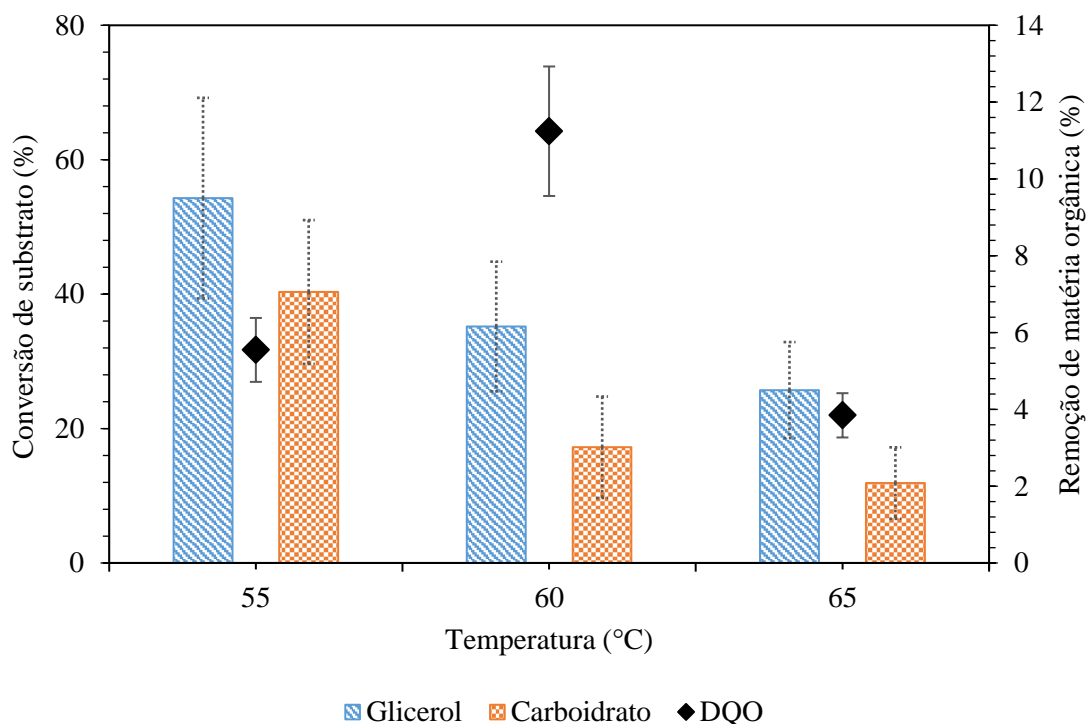


Figura 63. Efeito do aumento da temperatura de operação nas remoções de carboidratos totais, glicerina e DQO no RALF-AT

O aumento das temperaturas na faixa (hiper) termofílica provavelmente reduziu a conversão de substratos porque as altas temperaturas podem causar desnaturação da proteína celular e inativar enzimas-chave para o desenvolvimento celular (ELBESHBISHY et al., 2017). Portanto, a baixa concentração de biomassa em alta temperatura pode resultar em baixa conversão de substrato. Da mesma forma, o aumento da temperatura de 55 °C para 65 °C em um RALF alimentado com vinhaça ocasionou diminuição na conversão de carboidratos de 66%



para 51% no estudo de Ramos e Silva (2017). Um AnSTBR termofílico (55 °C) também apresentou maior conversão de carboidratos (51%) (FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019) do que o hipertermofílico (70 °C) (36%) (NIZ et al., 2019) sob condições operacionais similares ( $\sim 100 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ). Niz et al. (2019) atribuíram essa ocorrência à redução na produção de exopolímeros em condições hipertermofílicas, o que resulta no desenvolvimento de biomassa em suspensão. No caso do RALF, o crescimento suspenso de biomassa pode causar lavagem celular devido às características hidrodinâmicas do reator e resultar em menor conversão de carboidratos em 65 °C (11,9%) do que a observada em AnSTBR (36%).

A conversão mais elevada de glicerol em todas as temperaturas de operação no RALF-AT pode ter sido desencadeada em 55 °C. Nesta temperatura, os microrganismos se adaptaram ao glicerol como substrato para obtenção de energia devido à baixa concentração de componentes biodegradáveis na vinhaça. Então, com o aumento da temperatura, a redução da biomassa ativa no RALF-AT pode ter incorrido em eliminação de microrganismos com preferência por degradação de carboidratos, uma vez que, a biomassa foi inicialmente altamente adaptada ao glicerol em 55 °C. O aumento da temperatura também leva a maior esterilização da vinhaça dentro do reator (NIZ et al., 2019) e acarreta menor interferência de microrganismos autóctones deste substrato na fermentação. Por este motivo, a dismutação do glicerol ocorreu em todas as temperaturas de operação e foi observada elevada atividade da rota redutiva (Figura 64).

A concentração de 1,3-PDO permaneceu estável entre 947 – 1159  $\text{mg L}^{-1}$  em todas as temperaturas de operação e resultou em aumento do  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  de 0,48 em 55 °C para 0,67 e 0,74  $\text{mol 1,3-PDO mol}^{-1}$  glicerol em 60 °C e 65 °C, respectivamente. Os menores valores de  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  em 55 °C podem estar relacionados à maior acidificação no RALF-AT nesta condição operacional (36%). A maior acidificação em 55 °C pode ter ocorrido devido a maior diversidade de microrganismos na menor temperatura aplicada. Isto resultou na maior variabilidade de metabólitos na co-fermentação de vinhaça e glicerol. As concentrações de HPr, HAc e HBU em 55 °C foram iguais a 229, 260 e 355  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, o menor  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  em 55 °C coincidiu com a produção de hidrogênio ( $690 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1} \text{ L}^{-1}_{\text{leito}}$  e  $0,18 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ ) porque as vias de formação do hidrogênio e 1,3-PDO competem (GALLARDO et al., 2014). Cada mol de 1,3-PDO gerado requer um mol de hidrogênio (Equação (5.8)), e a produção de hidrogênio indica a utilização dos substratos na via oxidativa (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2020a). Paranhos e Silva (2020) usaram um AFBR mesofílico para fermentação de glicerol como único substrato e observaram que na condição operacional onde o  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  foi 0,53  $\text{mol 1,3-PDO mol}^{-1}$  glicerol, o HY foi 0,02  $\text{mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ . Por

outro lado, a condição que atingiu um HY de  $1,22 \text{ mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$  resultou em um  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  de  $0,19 \text{ mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}$  (PARANHOS; SILVA, 2020).

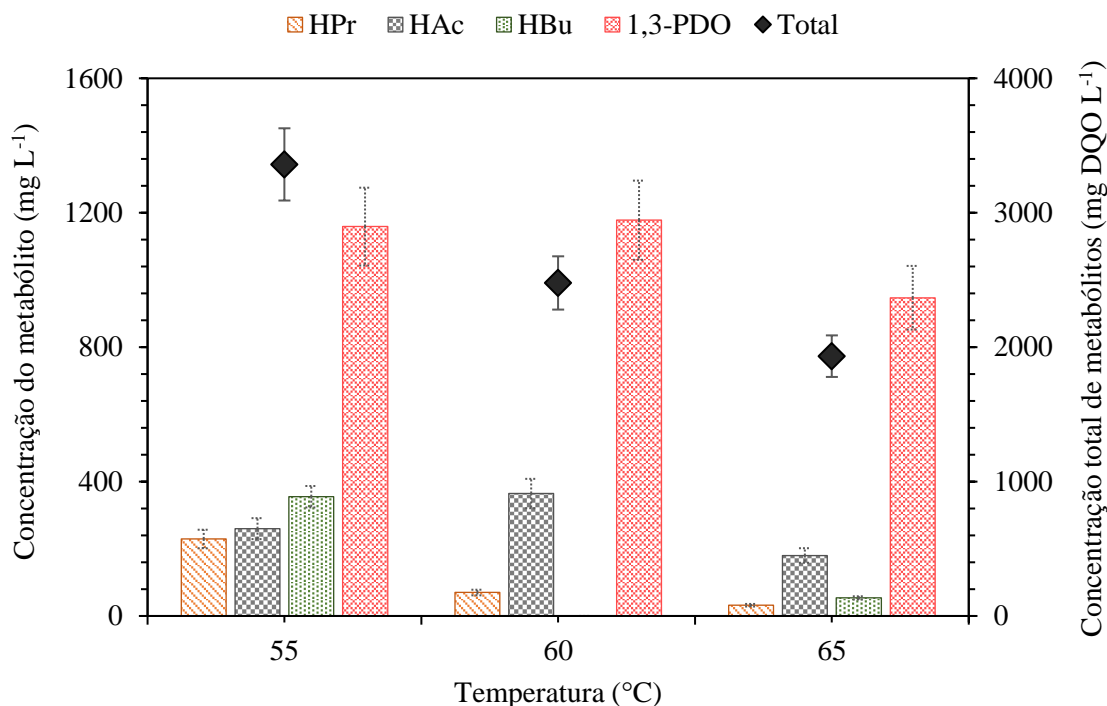


Figura 64. Efeito do aumento da temperatura de operação na produção de metabólitos líquidos no RALF-AT

O aumento de NADH é necessário para maximizar a geração de 1,3-PDO (DAHIYA; VENKATA MOHAN, 2021). Porém, os menores valores de  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  foram observados em  $55 \text{ °C}$  devido a um desequilíbrio na razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  causado pelo aumento da geração de NADH pelo ramo oxidativo. Nesse caso, a regulação na razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  foi obtida pela geração de compostos menos oxidados a partir da fermentação de carboidratos e glicerol, como como os HBU e HPr. Então, a geração de HPr associada à geração de 1,3-PDO justificam os baixos valores de HY em  $55 \text{ °C}$ . Enquanto a formação de HBU e HPr justificam os menores valores de  $Y_{1,3\text{-PDO}}$ . Isto porque enquanto a geração de HAc produz 3 moles de NADH (Equação (5.5)), a geração de HBU, HLa e EtOH a partir do piruvato requer a oxidação de  $\text{NAD}^+$  (XIU et al., 2007). Portanto, o máximo  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  da fermentação de glicerol como um único substrato é observado quando HAc é produzido como um co-metabólito (2 mol de 1, 3-PDO por mol de HAc) (PFLÜGL et al., 2012).

A informação de que a maximização do  $Y_{1,3\text{-PDO}}$  é obtida por meio da geração de HAc como co-metabólito é confirmada pelo perfil de metabólitos ao aumentar a temperatura para

60 °C e 65 °C (Figura 64). O aumento da temperatura para 60 °C e 65 °C levou à redução significativa das concentrações de HPr e HBU para 32 e 54 mg L<sup>-1</sup> e foi observado aumento do  $Y_{1,3-PDO}$  para 0,67 e 0,74 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol, respectivamente, coincidindo com a formação majoritária de HAc como co-metabólito. Os valores de  $Y_{1,3-PDO}$  no RALF-AT coincidiram com a ausência de hidrogênio como componente do biogás em 60 °C e 65 °C. É válido mencionar que o  $Y_{1,3-PDO}$  em 65 °C foi superior ao máximo teórico  $Y_{1,3-PDO}$  (0,72 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol) da fermentação de glicerol como mono-substrato (GALLARDO et al., 2014). A este respeito, uma diferença entre a co-fermentação da vinhaça (substrato rico em sacarose posteriormente hidrolisado em glicose) e glicerol *versus* glicerol como um único substrato é que na co-fermentação o glicerol pode ser usado exclusivamente como um substrato para a geração de 1,3-PDO. Enquanto isso, a energia necessária para a síntese celular e NADH pode ser obtida inteiramente a partir da fermentação dos componentes da vinhaça. Portanto, a aplicação de temperaturas elevadas na fermentação de vinhaça e glicerol provavelmente fornece as condições ideais para a regulação sinérgica de microrganismos e possibilita a recuperação do 1,3-PDO a partir do glicerol.

#### 5.4.1.1 Efeito do aumento da temperatura na produção de metano em um e dois estágios

Na Figura 65 estão apresentados os valores de eficiência de remoção de carboidratos, glicerol e matéria orgânica nos RALF-ST e RALF-SM em diferentes combinações de temperatura do RALF-AT – RALF-ST e RALF-AT – RALF – SM. A redução da acidificação no RALF-AT de 31% para 23% e 18% ao aumentar a temperatura deste reator de 55 °C para 60 °C e 65 °C impactou diretamente a operação do RALF-SM, mesmo que as condições operacionais neste reator não tenham sido alteradas. Foi observado aumento da eficiência de remoção de carboidratos de 65,9% para 70% e redução da eficiência de remoção de matéria orgânica de 85,8% para 78,7% ao alterar a combinação de RALF-AT (55 °C) – RALF-SM (25 °C) para RALF-AT (65 °C) – RALF-SM (25 °C). Esta alteração foi significativa (valor-P 0,006) e pode ter sido ocasionada pelo aumento das concentrações de carboidratos de fácil degradação e glicerol no RALF-SM, uma vez que, a degradação destes foi reduzida no RALF-AT. A degradação desses substratos no reator metanogênico podem ter acarretado maior produção de AGVs. Além disso, a concentração de sulfato afluyente ao RALF-SM foi reduzida em 2,4-vezes da combinação RALF-AT (55 °C) – RALF-SM para a RALF-AT (65 °C) – RALF-SM (25 °C). Então, com a provável diminuição da oxidação de 1,3-PDO e HPr por *Desulfovibrio* no RALF-SM devido a diminuição da concentração de sulfato pode ter ocorrido

acúmulo dos AGVs formados e consequentemente redução da eficiência de remoção de matéria orgânica. De fato, foi observado aumento da concentração de HPr de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  na combinação RALF-AT (55 °C) – RALF-SM para  $517 \text{ mg L}^{-1}$  na combinação RALF-AT (65 °C) – RALF-SM (25 °C).

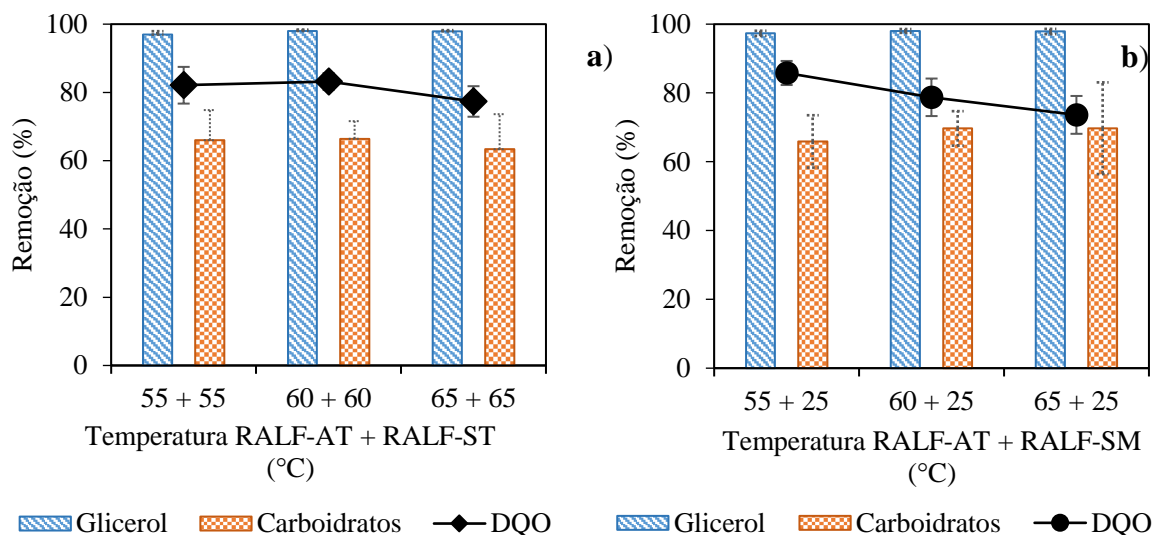


Figura 65. Remoções de carboidratos totais, glicerina e matéria orgânica nos RALF-ST (a) e RALF-SM (b) em função das temperaturas aplicadas aos RALF-AT e RALF-ST

No RALF-ST não foram observadas alterações significativas ( $F < F_{\text{crítico}}$ ) dos valores de remoção de carboidratos, glicerol e matéria orgânica nas diferentes combinações de temperatura. Esta ocorrência indica que o aumento da concentração de substratos não-acidificados, devido a redução do desempenho fermentativo no RALF-AT, foi compensado pelo provável aumento da atividade de microrganismos hidrolíticos e acidogênicos no RALF-ST. Niz et al. (2019) reportaram que as taxas de hidrólise e acidogênese foram aumentadas em 70 °C. Romero-Güiza et al. (2021) relataram que a adoção de temperaturas entre 60 e 75 °C pode aumentar as taxas de reações nos primeiros estágios de degradação de moléculas orgânicas. Nesse caso, a redução da variabilidade de metabólitos no efluente do RALF-AT devido ao acréscimo da temperatura pode ter incorrido em maior eficiência de degradação das moléculas orgânicas no RALF-ST.

Niz et al. (2021) realizaram a digestão de vinhaça em AnSTBR (70 °C) – AnSTBR (70 °C) e observaram PVM negligenciável no estágio metanogênico causada por ausência de arqueias acetoclásticas, apesar de prevaletimento de *Methanothermobacter*. No RALF-ST foram identificados microrganismos filogeneticamente associados a *Methanothrix*, *Methanothermobacter* e *Methanosarcina* em  $10 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , além de *Tepidanaerobacter*.

Duas hipóteses podem ser levantadas a partir dessas informações: i) a operação estável e por longo período do RALF-ST contribuiu para que a microbiota não fosse afetada pelo aumento da temperatura de operação de 55 °C para 65 °C; e ii) o favorecimento de *Methanothermobacter* em temperaturas elevadas (DONG et al., 2018) e o sintrofismo entre *Tepidanaerobacter* (SAOB) e *Methanothermobacter* colaboraram para a oxidação e, portanto, não acumulação de AGVs no reator.

As performances dos RALF-ST e RALF-SM quanto as remoções de matéria orgânica se refletiram nas produtividades de metano destes reatores (Figura 66). No RALF-ST não foi observada alteração significativa dos valores de MY (248 – 276 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) e PVM (4,36 – 5,00 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) nas temperaturas aplicadas (valor-P 0,154331). Entretanto, no RALF-SM os valores de MY (294 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) e PVM<sub>leito</sub> (4,34 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>leito</sub>) em RALF-AT (65 °C) – RALF-SM (25 °C) foram inferiores aos observados em RALF-AT (55 °C) – RALF-SM (25 °C) (324 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> e 4,79 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, respectivamente). Estes dados confirmam as afirmações de que as alterações de desempenho fermentativo do RALF-AT influenciam na produtividade de metano em segundo estágio. Isto é verdade pois as alterações mais significativas de desempenho ocorreram em reator operado constantemente em 25 °C, mesmo que a combinação (hiper) termofílico – mesofílico seja associada à estabilidade operacional (WEIDE et al., 2020; ROMERO-GÜIZA et al., 2021).

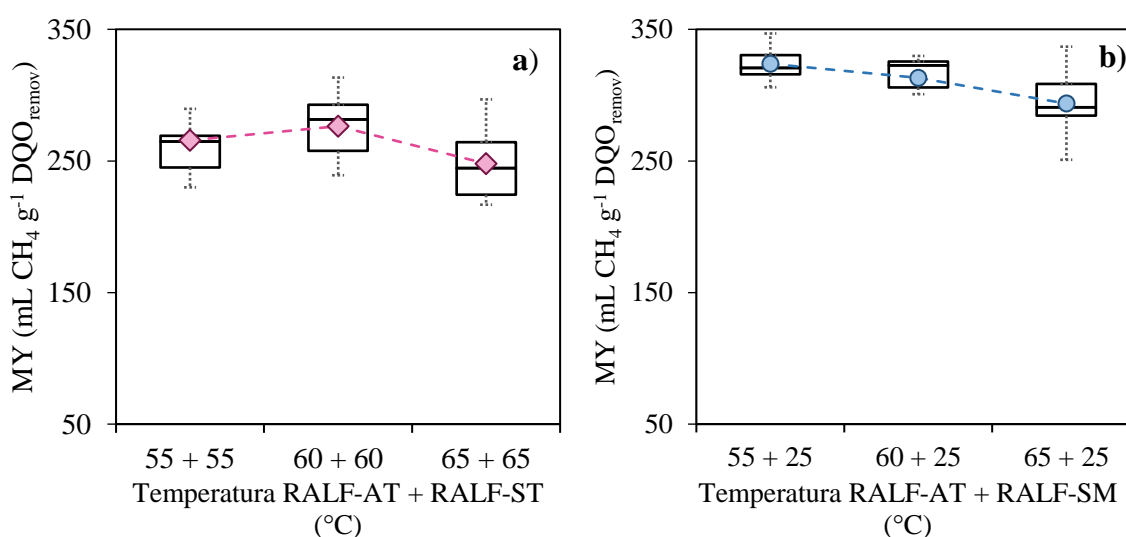


Figura 66. MY dos RALF-ST (a) e RALF-SM (b) em função das temperaturas aplicadas aos RALF-AT e RALF-ST

Na Figura 67 estão apresentados os valores de eficiência de remoção de carboidratos, remoção de glicerol, remoção de matéria orgânica do RALF-MT em função da temperatura

aplicada. O aumento da temperatura de 55 °C para 60 °C ocasionou aumento das eficiências de remoção de carboidratos de 45,9% para 76,7% e de matéria orgânica de 75,5% para 87,2% no RALF-MT. Os valores de MY do RALF-MT também permaneceram estáveis entre 279 e 295 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub> ao aumentar a temperatura de 55 °C para 65 °C (Figura 68). A performance de remoção de matéria orgânica do RALF-MT em 60 C foi superior as performances dos RALF-ST (83,2%) e RALF-SM (78,7%). O valor médio de MY do RALF-MT em 65 °C (294 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>) se igualou ao observado na combinação RALF-AT (65 °C) – RALF-SM (25 °C) e ambos superaram ao MY observado em RALF-AT (65 °C) – RALF-ST (65 °C) (248 mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>). Estes dados indicam que a co-digestão de vinhaça e glicerol permitiu operação estável sob condição (hiper) termofílica em RALFs de um e dois estágios. Tal resultado não foi possibilitado na mono-digestão hipertermofílica de vinhaça como mono-substrato em AnSTBR (NIZ et al., 2021).

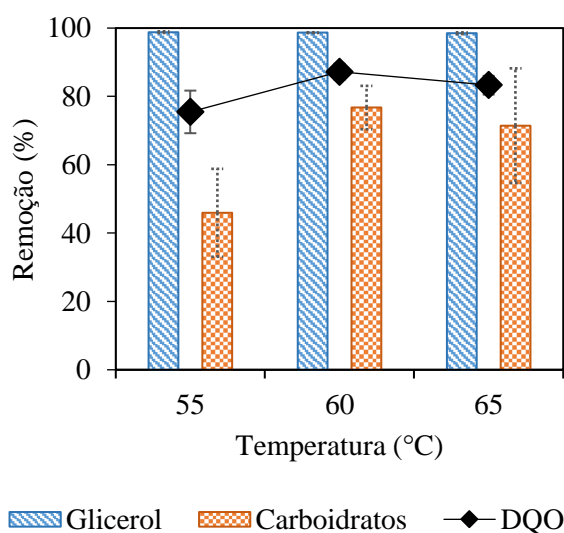


Figura 67. Remoções de carboidratos totais, glicerina e matéria orgânica do RALF-MT em função das temperaturas aplicadas

A PVM<sub>leito</sub> no RALF-MT aumentou de  $4,82 \pm 0,46$  para  $5,89 \pm 0,87$  L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> ao aumentar a temperatura de 55 °C para 60 °C. Entretanto, este acréscimo não pode ser associado ao aumento de temperatura. Os valores de PVM<sub>leito</sub> no RALF-MT em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C foram coletados a partir da utilização de lote de vinhaça com elevada concentração de matéria orgânica, baixa concentração de carboidratos totais e elevada concentração de sulfato em relação aos lotes utilizados em 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> + 60/65 °C e 5; 7,5; 15 e 20 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> + 55 °C (Tabela 9). Essa variação de composição da vinhaça se refletiu na PVM<sub>leito</sub>, que permaneceu estável entre 4,41 e 4,82 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> ao aumentar a TCO de 7,5 para

10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, contrariando o aumento linear da PVM<sub>leito</sub> ao negligenciar a condição operacional de 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e 55 °C (Figura 69).

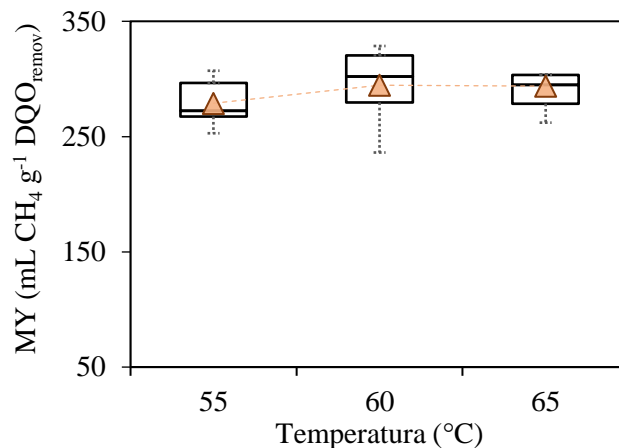


Figura 68. MY do RALF-MT em função das temperaturas aplicadas

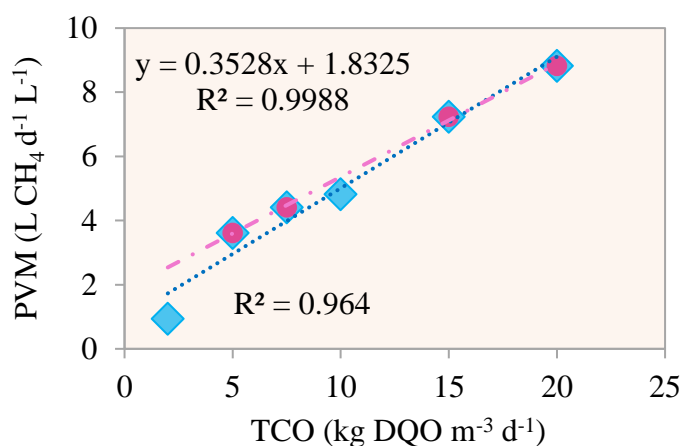


Figura 69. Regressão linear dos dados de PVM<sub>leito</sub> em função da TCO aplicada ao RALF-MT em: (a) todas as condições operacionais (.....) e (b) negligenciando os dados em TCO de 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (- - -)

A PVM<sub>leito</sub> calculada a partir da equação da reta de regressão linear foi de 5,36 L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>. Portanto, desconsiderando os efeitos da composição da vinhaça é possível afirmar que a produtividade de metano no RALF-MT não foi influenciada pelo aumento da temperatura.

## 5.5 PERFORMANCE GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Na Tabela 36 estão apresentadas as comparações de fermentação e digestão (em um e dois estágios) de vinhaça e glicerina como mono-substratos e cossustratos em RALF. A co-fermentação de vinhaça e glicerina apresentou um efeito antagônico de produção de hidrogênio em relação às fermentações de vinhaça e glicerina como mono-substratos. Essa ocorrência foi associada à rota redutiva do glicerol desencadeada pelo aumento de NADH devido a adição de vinhaça em 60 e 90 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> não foi observada atividade da rota redutiva. Porém, a produtividade de hidrogênio da co-fermentação foi diminuída em relação às mono-fermentações devido ao prevaletimento da rota de alongamento de HLa e acetato à HBU. Este resultado é corroborado pela composição taxonômica do reator. Em 120 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> foram identificados microrganismos pertencentes aos gêneros *Lacticaseibacillus* e *Clostridium*. Além disso, foram detectados os genes *ldhA*, *LDH*, *ldh* que podem ser associados a via de conversão de HLa a HBU.

Do ponto de vista de recuperação de metabólitos líquidos a partir da fermentação de vinhaça e glicerina como cossustratos, a produção de 1,3-PDO foi elevada. Além disso, o rendimento de produção de 1,3-PDO foi melhorado pelo aumento da temperatura de operação de 55 °C para 65 °C (0,48 para 0,74 mol 1,3-PDO mol<sup>-1</sup> glicerol).

Estudos futuros devem focar no ajuste de condições operacionais no reator acidogênico (hiper) termofílico para melhorar a produtividade de 1,3-PDO a partir da fermentação de vinhaça e glicerina, uma vez que, é interessante dos pontos de vista econômico e sustentável a síntese deste químico a partir de resíduos.

Apesar do efeito antagônico observado no reator hidrogenogênico e da geração de composto potencialmente prejudicial a metanogênese em segundo estágio (1,3-PDO), a performance de produção de metano em dois estágios na co-digestão de glicerol e vinhaça superou a observada em mono-digestão de vinhaça (Tabela 36). A digestão mesofílica apresenta vantagem sobre a termofílica até 10 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, i.e., de eliminação da necessidade de agente tamponante. Porém, para TCO elevadas foi observada maior estabilidade de remoção de matéria orgânica e produção de metano no digestor termofílico do que no mesofílico. O digestor termofílico também se mostrou mais estável ao aumento da temperatura de operação do reator acidogênico. De fato, tanto o aumento da TCO quanto da temperatura de operação influenciou na composição do efluente acidogênico na digestão em dois estágios.



Tabela 36. Comparação entre os resultados de fermentações e digestões de vinhaça e glicerina como mono-substratos com os observados na co-digestão de 50% vinhaça: 50% glicerina em RALF

<b>Reator acidogênico</b>							
Substrato	Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TDH (h)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Rendimento <sup>a</sup>	Produção volumétrica <sup>b</sup>	Referência
Vinhaça	55	10	4	60	2,77	16,1	(SANTOS et al., 2014b)
Glicerol	55	10	4	60	0,98 <sup>c</sup>	8,8	(SIMÕES et al., 2021)
Co-fermentação	55	20	4	120	0,29	1,3	RALF-AT
<b>Reator metanogênico de estágio único</b>							
Substrato	Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TDH (h)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Rendimento <sup>d</sup>	Produção volumétrica <sup>e</sup>	Referência
Vinhaça	55	7,5	24	7,5	300	3,8	(RAMOS; SILVA, 2020)
Glicerol	55	7,5	24	7,5	275	2,0	(T.B. COSTA et al., 2021)
Co-digestão	55	15	24	7,5	269	7,2	RALF-MT
<b>Reator metanogênico alimentado com efluente acidogênico</b>							
Substrato	Temperatura	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	TDH (h)	TCO (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Rendimento <sup>d</sup>	Produção volumétrica <sup>f</sup>	Referência
Vinhaça	55	10	18	13,3	240	2,7	(RAMOS et al., 2021)
Co-digestão	55	20	24	20	270	4,5	RALF-ST
Vinhaça	25	10	18	13,3	220	2,5	(RAMOS et al., 2021)
Co-digestão	25	20	24	20	269	3,9	RALF-SM

<sup>a</sup>: mmol H<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>aplicada</sub>; <sup>b</sup>: L H<sub>2</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>: mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol; <sup>d</sup>: mL CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DQO<sub>removida</sub>; <sup>e</sup>: L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>leito</sub>; <sup>f</sup>: L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup><sub>reator</sub>

Não foi observada diferença significativa entre a digestão mesofílica e a termofílica de efluente acidogênico para TCO até  $15 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Essa similaridade se refletiu na composição da biomassa dos reatores, que apresentaram balanceamento similar entre abundâncias relativas de arqueias acetoclásticas e hidrogenotróficas. Além disso, a composição microbiana do reator de dois estágios termofílico apresentou maior semelhança com a composição do reator mesofílico de dois estágios do que com a composição do reator termofílico de um estágio. Em  $20 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , o reator mesofílico apresentou falha, inferida pelas reduções da eficiência de remoção de matéria orgânica e da produção de metano. Esta falha pode ser relacionada a elevadas concentrações de HBU e HPr oriundas do reator acidogênico. É válido mencionar que a degradação completa de 1,3-PDO e HPr em ambos os reatores pode ter sido possibilitada pelo sulfato da vinhaça.

A co-digestão de vinhaça e glicerina em um estágio apresentou efeito sinérgico de produção de metano e remoção de matéria orgânica e permitiu a aplicação de TCOs mais elevadas quando comparada a mono-digestão de vinhaça e de glicerina (Tabela 36). Isto ocorreu devido à redução da contribuição de compostos recalcitrantes da vinhaça pela adição de glicerol. Adicionalmente, a adição de vinhaça à glicerina proporcionou menores acúmulos de ácidos voláteis, comuns na mono-digestão de glicerol, devido aos diferentes tempos de degradação dos compostos da vinhaça. O balanceamento da co-digestão de vinhaça e glicerina foi corroborado pela composição microbiana no reator de estágio único, uma vez que, a predominância de *Methanotherix* é atribuída a processos estáveis e de baixo acúmulo de acetato. Além da estabilidade da co-digestão termofílica de vinhaça e glicerol em RALF a aplicação de TCOs elevadas, foi observada estabilidade da produção de metano e remoção de matéria orgânica na co-digestão deste substrato ao aumentar a temperatura para  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em contrapartida, foi observada influência da composição de vinhaça no processo em um estágio, enquanto essa influência foi atenuada na digestão em dois estágios devido a inserção do reator acidogênico.

No geral, a co-digestão de vinhaça e glicerol foi estável em um e dois estágios. Então, os ganhos da co-digestão de vinhaça em dois estágios em relação a um estágio só são evidentes para maximização da produção e futura extração de metabólitos no reator acidogênico e para casos de variações significativas da composição de vinhaça afluente aos reatores. Estudos adicionais devem ser conduzidos para melhoria da acidificação de vinhaça e glicerol.

## 6 CONCLUSÃO

**Hipótese central:** a adição de glicerina como cossustrato à vinhaça de cana-de-açúcar permite a aplicação de taxas de carregamento orgânico mais elevadas na fermentação e digestão destes substratos, i. e., com melhores performances nas eficiências de remoção de matéria orgânica, rendimentos de hidrogênio e rendimentos de metano em relação às performances observadas na utilização de glicerina e vinhaça como substratos únicos.

**Conclusão geral:** a hipótese foi parcialmente refutada. A fermentação e digestão de vinhaça e glicerina como cossustratos permite aplicação de taxas de carregamento orgânico elevadas. Além disso, as eficiências de remoção de matéria orgânica e rendimentos de metano foram elevados. No entanto, o rendimento de produção de hidrogênio no RALF acidogênico termofílico foi reduzido pela co-fermentação em relação à mono-fermentação desses substratos.

**Hipótese secundária 1 (para a co-digestão de vinhaça e glicerina):** a co-digestão de vinhaça e glicerina em RALF resulta em maiores valores de remoção de matéria orgânica, produtividade de metano e rendimento de metano do que a digestão de vinhaça e glicerina como mono-substratos. Além disso, a co-digestão possibilita a variação de temperatura dentro da faixa (hiper) termofílica sem alteração dos indicadores de desempenho do reator.

**Conclusão secundária 1:** a hipótese foi confirmada.

**Hipótese secundária 2 (para co-fermentação de vinhaça e glicerina):** a co-fermentação termofílica de vinhaça e glicerina em RALF resulta em maiores acidificação, rendimento de produção de hidrogênio e tolerância a taxas de carregamento orgânico elevadas do que a mono-fermentação destes substratos. Adicionalmente, o aumento da temperatura na faixa (hiper) termofílica aumenta a seletividade de metabólitos produzidos e, consequentemente, o rendimento de produção de hidrogênio na co-fermentação de vinhaça e glicerina.

**Conclusão secundária 2:** a hipótese foi parcialmente refutada. A co-fermentação de vinhaça e glicerina não resultou em maior acidificação em relação à mono-fermentação destes substratos e o aumento da temperatura não acarretou acréscimos da produtividade de

hidrogênio. Porém, a seletividade de rendimento de 1,3-propanodiol foi beneficiada pelo aumento da temperatura.

**Hipótese secundária 3 (para co-digestão de efluente de reator acidogênico utilizado na co-fermentação de vinhaça e glicerina):** a co-digestão de efluente de RALF alimentado com vinhaça e glicerina (proporção 50%:50% em base DQO) resulta em eficiências de remoção de matéria orgânica e rendimentos de produção de metano mais elevados do que a co-digestão de vinhaça e glicerina em estágio único. Além disso, o RALF mesofílico alimentado com efluente de reator acidogênico (hiper) termofílico apresenta melhores performances de remoção de matéria orgânica e produção de metano do que o RALF (hiper) termofílico.

**Conclusão secundária 3:** a hipótese foi confirmada. Apesar da queda de desempenho do RALF metanogênico mesofílico causada pelo aumento da temperatura de operação no RALF acidogênico termofílico foi observado que as performances de produção de metano e remoção de matéria orgânica do RALF metanogênico mesofílico superaram a performance do RALF metanogênico termofílico.

## REFERÊNCIAS

- AGLER, M. T. et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–78, fev. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779910002027>>.
- AGUILAR-AGUILAR, F. A. et al. Optimization of hydrogen yield from the anaerobic digestion of crude glycerol and swine manure. **Catalysts**, v. 9, n. 4, 2019.
- AHMED, W.; RODRÍGUEZ, J. A model predictive optimal control system for the practical automatic start-up of anaerobic digesters. **Water Research**, v. 174, p. 115599, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115599>>.
- AHN, J. H.; FORSTER, C. F. Kinetic analyses of the operation of mesophilic and thermophilic anaerobic filters treating a simulated starch wastewater. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1–2, p. 19–23, 2000.
- AINALA, S. K. et al. Glycerol assimilation and production of 1,3-propanediol by *Citrobacter amalonaticus* Y19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 5001–5011, 2013.
- ALBANEZ, R. et al. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 45, p. 20473–20484, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.145>>.
- ALBANEZ, R. et al. Anaerobic biological treatment of vinasse for environmental compliance and methane production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 21–43, 2016b.
- ALBANEZ, R. et al. Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (Sugarcane stillage) and Molasses in an Ansbbr. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27–41, 2018.
- ALI, N. et al. Evaluation of bacterial association in methane generation pathways of an anaerobic digesting sludge via metagenomic sequencing. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 1, p. 31–41, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-019-01716-x>>.

ALMEIDA, W. A. et al. AnSBBR applied to biomethane production for vinasse treatment: Effects of organic loading, feed strategy and temperature. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 759–773, 2017.

ANDALIB, M. et al. Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR). **Bioresource Technology**, v. 121, p. 411–418, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.008>>.

ANDRIAMANOHIARISOAMANANA, F. J. et al. Anaerobic co-digestion of dairy manure, meat and bone meal, and crude glycerol under mesophilic conditions: Synergistic effect and kinetic studies. **Energy for Sustainable Development**, v. 40, p. 11–18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.esd.2017.05.008>>.

ANDRIAMANOHIARISOAMANANA, F. J. et al. Semi-continuous anaerobic co-digestion of dairy manure, meat and bone meal and crude glycerol: Process performance and digestate valorization. **Renewable Energy**, v. 128, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.056>>.

AO, T. et al. Comparison of microbial community structures between mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of vegetable waste. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 6, p. 1201–1214, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02519-5>>.

APHA; AWWA; WEF. **PHA: Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater**, twenty-first ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation, Washington DC USA. Centennial ed. [s.l.: s.n.]

AQUINO, S. de; FUESS, L. T.; PIRES, E. C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 219–228, jul. 2017.

ASTALS, S. et al. Co-digestion of pig manure and glycerine: Experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091–1096, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.014>>.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 62, p. 73–78, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.06.040>>.

BALAGUER, M. D.; VICENT, M. T.; PARÍS, J. M. Anaerobic fluidized bed reactor with sepiolite as support for anaerobic treatment of vinasse. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 5, p. 433–438, 1992.

BARROS, V. G. de et al. Improved methane production from sugarcane vinasse with filter cake in thermophilic UASB reactors, with predominance of *Methanothermobacter* and *Methanosarcina* archaea and *Thermotogae* bacteria. **Bioresource Technology**, v. 244, n. May, p. 371–381, 2017.

BARROS, V. G. de; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. de. Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 628–639, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.021>>.

BEGUM, S. et al. Comparison of mesophilic and thermophilic methane production potential of acids rich and high-strength landfill leachate at different initial organic loadings and food to inoculum ratios. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136658, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136658>>.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 36–42, 2013.

BERNAL, A. P. et al. Vinasse biogas for energy generation in Brazil: An assessment of economic feasibility, energy potential and avoided CO<sub>2</sub> emissions. **Journal of Cleaner Production**, v. 151, p. 260–271, maio 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.064>>.

BERNAL, A. P.; DE MENEZES, C. A. de; SILVA, E. L. A new side-looking at the dark fermentation of sugarcane vinasse: Improving the carboxylates production in mesophilic EGSB by selection of the hydraulic retention time and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 24, p. 12758–12770, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.01.161>>.

BERNAT, K. et al. Leachate after aerobic stabilization of municipal solid waste supplemented by waste glycerine from saponification to improve biogas production during co-digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, n. December 2020, 2021.

BEZERRA, R. A. et al. Effect of organic load on the performance and methane production of an ansbbr treating effluent from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 347–368, set. 2011.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONCZ, M. A. et al. Application of urea dosing for alkalinity supply during anaerobic digestion of vinasse. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 11, p. 2453–2460, 2012.

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 3, p. 153–157, 2005.

BOONSAWANG, P. et al. Effect of pH, OLR, and HRT on performance of acidogenic and methanogenic reactors for treatment of biodiesel wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 54, n. 12, p. 3317–3327, 2015.

BORGES, A. do V. et al. Co-digesting sugarcane vinasse and distilled glycerol to enhance bioenergy generation in biofuel-producing plants. **Energy Conversion and Management**, v. 250, n. August, 2021.

BORGES, A. do V. et al. Co-digestion of biofuel by-products: Enhanced biofilm formation maintains high organic matter removal when methanogenesis fails. **Journal of Environmental Management**, v. 310, n. November 2021, 2022.

BOTELLO SUÁREZ, W. A. et al. Predominance of syntrophic bacteria, *Methanosaeta* and *Methanoculleus* in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating coffee processing wastewater at high organic loading rate. **Bioresource Technology**, v. 268, n. July, p. 158–168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.091>>.

BUITRÓN, G. et al. Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H<sub>2</sub> -SBR + CH<sub>4</sub> -UASB) using tequila vinasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19249–19255, nov. 2014.

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and



hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9071–9077, 2010.

BUITRÓN, G.; MARTÍNEZ-VALDEZ, F. J.; OJEDA, F. Evaluation of the methane production rate from an acidogenic effluent generated in a two-stage process treating winery wastewater. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 4, p. 987–995, 2020.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713–6733, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>>.

CABRERA-DÍAZ, A. et al. Anaerobic digestion of sugarcane vinasse through a methanogenic uasb reactor followed by a packed bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1127–1145, 2017.

CAILLET, H.; ADELARD, L. Start-up strategy and process performance of semi-continuous anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 1, p. 185–198, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-020-00964-z>>.

CALLEJAS, C. et al. Temporal analysis of the microbiota involved in the anaerobic degradation of sugarcane vinasse in a full-scale methanogenic UASB reactor. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.

CAMARGO, F. P. et al. Microbial and functional characterization of granulated sludge from full-scale UASB thermophilic reactor applied to sugarcane vinasse treatment. **Environmental Technology**, p. 1–20, 17 mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2022.2052361>>.

CAROSIA, M. F. et al. Homoacetogenesis: New insights into controlling this unsolved challenge by selecting the optimal C/N ratio, C/P ratio and hydraulic retention time. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 145, p. 273–284, 2021.

CASTRILLÓN, L. et al. Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7845–7849, 2011.

CASTRILLÓN, L. et al. Methane production from cattle manure supplemented with crude glycerin from the biodiesel industry in CSTR and IBR. **Bioresource Technology**, v. 127, p.

312–317, 2013a.

CASTRILLÓN, L. et al. Thermophilic co-digestion of cattle manure and food waste supplemented with crude glycerin in induced bed reactor (IBR). **Bioresource Technology**, v. 136, p. 73–77, 2013b.

CAVALCANTE, W. de A. et al. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 106–119, mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024>>.

CETECIOGLU, Z. et al. COD/sulfate ratio does not affect the methane yield and microbial diversity in anaerobic digesters. **Water Research**, v. 155, p. 444–454, 2019.

CHAVALPARIT, O. et al. Anaerobic co-digestion of hydrolysate from alkali pre-treated oil palm empty fruit bunches with biodiesel waste glycerol. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 20, n. 1, p. 336–344, 2018.

CHEN, H. et al. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of aqueous phase generated from hydrothermal liquefaction of cornstalk: Molecular and metabolic insights. **Water Research**, v. 168, p. 115199, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115199>>.

CHEN, Y.; YIN, Y.; WANG, J. Comparison of fermentative hydrogen production from glycerol using immobilized and suspended mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 13, p. 8986–8994, fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.01.003>>.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella sp.* TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9580–9587, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.083>>.

CHOU, Y. C.; SU, J. J. Biogas production by anaerobic co-digestion of dairy wastewater with the crude glycerol from slaughterhouse sludge cake transesterification. **Animals**, v. 9, n. 9, 2019.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use.

**Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>>.

CONAB. Observatório Agrícola: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2022/2023. Primeiro levantamento. April/2022. v. 8, n. 2, p. 63, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>.

CONKLIN, A.; STENSEL, H. D.; FERGUSON, J. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. **Water Environment Research**, v. 78, n. 5, p. 486–496, 2006.

COSTA, R. B. et al. Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors: Influence of electron donors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. August 2020, p. 123622, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123622>>.

COSTA, T. B. et al. Anaerobic biodegradation of biodiesel industry wastewater in mesophilic and thermophilic fluidized bed reactors: enhancing treatment and methane recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021.

CROSSE, A. J. et al. Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of “dirty” glycerol as an industrial fermentation substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 1–5, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2776-9>>.

CUBAS-CANO, E. et al. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, p. 290–303, 2018.

DAHIYA, S.; VENKATA MOHAN, S. Selective enrichment of mixed consortia towards enhanced 1,3-Propanediol production from glycerol. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 47, n. August 2020, p. 101337, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101337>>.

DE ALBUQUERQUE, J. N. et al. Thermophilic biomethane production by vinasse in an AnSBBR: Start-up strategy and performance optimization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 717–731, 2019.

DE ALBUQUERQUE, J. N. et al. Anaerobic sequencing batch reactors co-digesting whey and

glycerin as a possible solution for small and mid-size dairy industries: environmental compliance and methane production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, n. 3, p. 979–998, 2020.

DE CASTRO, T. M. et al. Anaerobic co-digestion of industrial landfill leachate and glycerin: methanogenic potential, organic matter removal and process optimization. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 41, n. 20, p. 2583–2593, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1575915>>.

DE CASTRO, T. M. et al. Anaerobic co-digestion of industrial waste landfill leachate and glycerin in a continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structured bed (ABFSB): Effects of volumetric organic loading rate and alkaline supplementation. **Renewable Energy**, v. 164, p. 1436–1446, 2021.

DE MENEZES, C. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from sugarcane juice in expanded granular sludge bed reactors under mesophilic conditions: The role of homoacetogenesis and lactic acid production. **Industrial Crops and Products**, v. 138, n. July, p. 111586, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019305977>>.

DE SANTANA, J. S. et al. Production of 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans* from agro-industrial residues and cactus cladode acid hydrolyzate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 5, p. 1585–1601, 2021.

DE VRIEZE, J. et al. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.079>>.

DEL NERY, V. et al. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugarcane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, n. March, p. 411–417, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.002>>.

DETMAN, A. et al. Evaluation of acidogenesis products' effect on biogas production performed with metagenomics and isotopic approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–25, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-021-01968-0>>.

DIAS, M. O. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>>.

DIETZ, D.; ZENG, A. P. Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 225–233, 2014.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile acids by direct titration. v. 33, n. 4, p. 356–365, 1961.

DINH, N. T. et al. Changes in the microbial community during the acclimation stages of the methane fermentation for the treatment of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 240–249, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.022>>.

DOLL, M. M. R.; FORESTI, E. Effect of the sodium bicarbonate in the treatment of vinasse in AnSBBR operated at 55 and 35 °C. **Engenharia Sanitaria E Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 275–282, 2010.

DONG, N. et al. Performance and microbial community of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic and extreme-thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 266, n. May, p. 454–462, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.105>>.

DOUNAVIS, A. S. et al. Production of Bio-Based Hydrogen Enriched Methane from Waste Glycerol in a Two Stage Continuous System. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 4, p. 677–689, 2016.

DOUNAVIS, A. S.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 701–708, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.072>>.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017>>.

DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer New York, 2006.

EDER, A. S. et al. Comparison of hydrogen and volatile fatty acid production by *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter aerogenes* singly, in co-cultures or in the bioaugmentation of microbial consortium from sugarcane vinasse. **Environmental**

**Technology and Innovation**, v. 18, p. 100638, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100638>>.

ELBESHBISHY, E. et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 656–668, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>>.

ENDO, G.; NOIKE, T.; MATSUMOTO, J. Characteristics of cellulose and glucose decomposition in acidogenic phase of anaerobic digestion. **Proceedings of the Japan Society of Civil Engineers**, v. 1982, n. 325, p. 61–68, 1982.

ESKICIOGLU, C. et al. Anaerobic digestion of whole stillage from dry-grind corn ethanol plant under mesophilic and thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1079–1086, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.061>>.

ESPINOZA-ESCALANTE, F. M. et al. Multiple response optimization analysis for pretreatments of Tequila's stillages for VFAs and hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5822–5829, 2008.

EWUNIE, G. A.; YIGEZU, Z. D.; MORKEN, J. Biochemical methane potential of Jatropha press cake: Effect of steam explosion pretreatment and co-digestion with crude glycerol. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 12, n. 6, 2020.

FABER, M. de O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.141>>.

FALENTIN, H. et al. The complete genome of propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA1T, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1–12, 2010.

FERRAZ JÚNIOR, A. et al. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245–252, 2016.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. et al. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of**

**Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16852–16862, 2014.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 81–88, 2015a.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94–105, ago. 2015b.

FERREIRA, J. dos S.; VOLSCHAN, I.; CAMMAROTA, M. C. Co-digestion of sewage sludge with crude or pretreated glycerol to increase biogas production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 21811–21821, 2018.

FERREIRA, T. B. et al. HRT control as a strategy to enhance continuous hydrogen production from sugarcane juice under mesophilic and thermophilic conditions in AFBRs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 36, p. 19719–19729, 2019.

FERREIRA, T. B. et al. Improved dark fermentation of cane molasses in mesophilic and thermophilic anaerobic fluidized bed reactors by selecting operational conditions. **International Journal of Energy Research**, v. 44, n. 13, p. 10442–10452, 25 out. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/er.5673>>.

FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 12, p. 3043–3047, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.016>>.

FREITAS, I. B. F.; DE MENEZES, C. A.; SILVA, E. L. An alternative for value aggregation to the sugarcane chain: Biohydrogen and volatile fatty acids production from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed reactors. **Fuel**, v. 260, n. October 2019, p. 116419, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116419>>.

FREUND, A. Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. **Monatshefte für Chemie**, v. 2, n. 1, p. 636–641, 1881.

FUESS, L. T. et al. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8132–8145, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.143>>.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>>.

FUESS, L. T. et al. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, n. July 2017, p. 426–433, jan. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>>.

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

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, dez. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>>.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. **Journal of Environmental Management**, v. 162, p. 102–114, out. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.046>>.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; DO NASCIMENTO, C. A. O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, p. 121379, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121379>>.

FUESS, L.; ZAIAT, M.; DO NASCIMENTO, C. A. O. Can biogas-producing sugarcane biorefineries techno-economically outperform conventional ethanol production? Deciphering the way towards maximum profitability. **Energy Conversion and Management**, v. 254, n. January, p. 115206, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.115206>>.



GALLARDO, R. et al. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 28–33, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.008>>.

GARCÍA-BECERRA, M. et al. Bio-hydrogen production from tequila vinasses: Effect of detoxification with activated charcoal on dark fermentation performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 60, p. 31860–31872, 2019.

GARCÍA-DEPRAECT, O. et al. Microbial ecology of a lactate-driven dark fermentation process producing hydrogen under carbohydrate-limiting conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 20, p. 11284–11296, 2021a.

GARCÍA-DEPRAECT, O. et al. A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. **Bioresource Technology**, v. 324, n. December 2020, 2021b.

GARCÍA, A. B.; CAMMAROTA, M. C. Biohydrogen production from pretreated sludge and synthetic and real biodiesel wastewater by dark fermentation. **International Journal of Energy Research**, n. August 2018, p. 1586–1596, 2019.

GODOI, L. A. G. de et al. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses generating as byproduct a viscous phase called molasses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 29267–29282, 2019.

GOMES, S. D. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8120–8131, 2016.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 6, p. 727–733, 2011.

HAGOS, K. et al. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. March, p. 1485–1496, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.184>>.

HANSEN, T. A. Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. v. 3, n. Iv, p. 165–185, 1994.

HARON, R. et al. Overview on utilization of biodiesel by-product for biohydrogen production. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 314–324, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.160>>.

HASSAN, S. R. et al. Recycled paper mill effluent treatment in a modified anaerobic baffled reactor: Start-up and steady-state performance. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, n. 3, p. 294–299, 2014.

HATTORI, S. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 2, p. 118–127, 2008.

HE, Q.; MCNUTT, J.; YANG, J. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. December 2016, p. 63–76, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.110>>.

HSU, Y.; SHIEH, W. K. Startup of anaerobic fluidized bed reactors with acetic acid as the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 3, p. 347–353, 1993.

HUBER, D. H. et al. Stress induced by crude glycerol in a thermophilic digester: microbial community divergence and resilience, but slow process recovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 24, p. 10769–10781, 2020.

HUPFAUF, S. et al. Temperature shapes the microbiota in anaerobic digestion and drives efficiency to a maximum at 45 °C. **Bioresource Technology**, v. 269, n. August, p. 309–318, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.106>>.

HUTŇAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODÍK, I. Anaerobic digestion of crude glycerol as sole substrate in mixed reactor. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13–14, p. 2179–2187, jul. 2013.

HYATT, D. et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 119, 29 jan. 2010.

ILTCHENCO, J. et al. Microbial consortia composition on the production of methane from sugarcane vinasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 2, p. 299–309, 2020.

INTANOO, P. et al. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 15, p. 11104–11112, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.129>>.

ITO, T. et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260–265, set. 2005.

JABARI, L. et al. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 2522–2527, 2012.

JIANG, H. et al. The startup performance and microbial distribution of an anaerobic baffled reactor (ABR) treating medium-strength synthetic industrial wastewater. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 53, n. 1, p. 46–54, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1368297>>.

JIANG, M. et al. Enhancing the performance of thermophilic anaerobic digestion of food waste by introducing a hybrid anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 341, n. July, p. 125861, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125861>>.

JOLLY, J. et al. Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: Effect of operating variables. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 188–194, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.003>>.

KACPRZAK, A.; KRZYSZEK, L.; LEDAKOWICZ, S. Co-digestion of agricultural and industrial wastes. **Chemical Papers**, v. 64, n. 2, p. 127–131, 2010.

KANCHANASUTA, S.; SILLAPARASSAMEE, O. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 3440–3446, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.032>>.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic**

**Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 3 mar. 2000. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2020.11439>>.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 4, p. 726–731, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>>.

KHATAMI, K. et al. Bioconversion of food waste to volatile fatty acids: Impact of microbial community, pH and retention time. **Chemosphere**, v. 275, 2021.

KIM, M.; AHN, Y.; SPEECE, R. . Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. **Water Research**, v. 36, n. 17, p. 4369–4385, out. 2002.

KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 199–207, jan. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305002734>>.

KIYUNA, L. S. M.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 103–112, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.028>>.

KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. A generalized method for thermodynamic state analysis of environmental systems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1–54, 2010.

KOSKINEN, P. E. P.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A. The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 742–758, 1 jul. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.21299>>.

LAMAISON, F. do C. et al. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 41, p. 14124–14133, nov. 2015. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319915022430>>.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LAZARO, C. Z. et al. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 12, p. 6407–6418, 2014.

LEE, C. S. et al. A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 235–244, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.033>>.

LI, D. et al. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 2015.

LI, J. et al. Syntrophic propionate degradation in anaerobic digestion: A review. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 5, p. 843–850, 2012.

LIM, E. Y. et al. Methanogenic pathway and microbial succession during start-up and stabilization of thermophilic food waste anaerobic digestion with biochar. **Bioresource Technology**, v. 314, n. May, p. 123751, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123751>>.

LIU, B. et al. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. **86th Annual Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference, WEFTEC 2013**, v. 4, n. 8, p. 2004–2013, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.135>>.

LIU, C. M. et al. Biogas production and microbial community properties during anaerobic digestion of corn stover at different temperatures. **Bioresource Technology**, v. 261, n. December 2017, p. 93–103, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.076>>.

LO, Y. C. et al. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15815–15822, 2013.

LOPES, H. J. S. et al. Simultaneous hydrogen and ethanol production in a thermophilic AFBR: a comparative approach between cellulosic hydrolysate single fermentation and the fermentation of glucose and xylose as co-substrates. **Cellulose**, v. 27, n. 5, p. 2599–2612, 2020.

LOPES, H. J. S.; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Co-fermentation of cheese whey and crude glycerol in egsb reactor as a strategy to enhance continuous hydrogen and propionic acid production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 712–728, 2017.

LOVATO, G. et al. Effect of feed strategy on methane production and performance of an ansbbr treating effluent from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2007–2029, abr. 2012.

LOVATO, G. et al. Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 126–143, 2016.

LOVATO, G. et al. Biohydrogen production by co-digesting whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 93–105, 2017a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.011>>.

LOVATO, G. et al. Design study of an AnSBBR for hydrogen production by co-digestion of whey with glycerin: Interaction effects of organic load, cycle time and feed strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9567–9576, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.125>>.

LOVATO, G. et al. Hydrogen production by co-digesting cheese whey and glycerin in an AnSBBR: Temperature effect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 81–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.007>>.

LOVATO, G. et al. Viability of using glycerin as a co-substrate in anaerobic digestion of sugarcane stillage (vinasse): effect of diversified operational strategies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 3, p. 720–740, 2019a.

LOVATO, G. et al. Methane production by co-digesting vinasse and whey in an ansbbr: effect of mixture ratio and feed strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 28–46, 2019b.

LOVATO, G. et al. Energetic feasibility of a two-stage anaerobic digestion system compared to a single-stage system treating whey and glycerin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, n. May, p. 107653, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107653>>.

LU, X. et al. Effect of influent COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratios on biodegradation behaviors of starch wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 175–183, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.100>>.

LYMPERATOU, A.; V. SKIADAS, I.; N. GAVALA, H. Anaerobic co-digestion of swine manure and crude glycerol derived from animal fat—Effect of hydraulic retention time. **AIMS Environmental Science**, v. 5, n. 2, p. 105–116, 2018.

MADIGOU, C. et al. Ecological consequences of abrupt temperature changes in anaerobic digesters. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n. December 2018, p. 266–277, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.003>>.

MAGRINI, F. E. et al. Effect of different heat treatments of inoculum on the production of hydrogen and volatile fatty acids by dark fermentation of sugarcane vinasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12198–12204, 2012.

MANOCHIO, C. et al. Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. June, p. 743–755, 2017.

MARU, B. T. et al. Biohydrogen production from glycerol using *Thermotoga* spp. **Energy Procedia**, v. 29, p. 300–307, 2012.

MARU, B. T. et al. Glycerol fermentation to hydrogen by *Thermotoga maritima*: Proposed pathway and bioenergetic considerations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 5563–5572, 2013.

MAZARELI, R. C. d. S. et al. Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: Screening design of factors that affect hydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, n. May, 2020.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

MEEGODA, J. N. et al. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, 2018.

MEIER, T. R. W. et al. Production of biohydrogen by an anaerobic digestion process using the residual glycerol from biodiesel production as additive to cassava wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, 2020a.

MEIER, T. R. W. et al. Assessment of the anaerobic digestion of crude glycerol, stillage, and swine wastewater mixtures. **Journal of Environmental Engineering**, v. 146, n. 9, p. 04020098, 2020b.

MENESES-REYES, J. C. et al. Oil-extracted *Chlorella vulgaris* biomass and glycerol bioconversion to methane via continuous anaerobic co-digestion with chicken litter. **Renewable Energy**, v. 128, p. 223–229, 2018.

MICHAUD, S. et al. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1385–1391, 2002.

MIRZOYAN, S.; TRCHOUNIAN, A.; TRCHOUNIAN, K. Hydrogen production by *Escherichia coli* during anaerobic utilization of mixture of lactose and glycerol: Enhanced rate and yield, prolonged production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 18, p. 9272–9281, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.02.114>>.

MONTEIRO, M. R. et al. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, n. November 2016, p. 109–122, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>>.

MORAES, B. de S. et al. Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 5, p. 594–601, maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.008>>.

MORAES, B. S. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil



from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825–835, jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>>.

MORAES, B. S. et al. Biogas production within the bioethanol production chain: Use of co-substrates for anaerobic digestion of sugar beet vinasse. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 227–234, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.089>>.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, abr. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>>.

MOSBÆK, F. et al. Identification of syntrophic acetate-oxidizing bacteria in anaerobic digesters by combined protein-based stable isotope probing and metagenomics. **ISME Journal**, v. 10, n. 10, p. 2405–2418, 2016.

MOSCOVIZ, R.; TRABLY, E.; BERNET, N. Consistent 1,3-propanediol production from glycerol in mixed culture fermentation over a wide range of pH. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.

MOTA, V. T.; ARAÚJO, T. A.; AMARAL, M. C. S. Comparison of aerobic and anaerobic biodegradation of sugarcane vinasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1402–1412, 9 jul. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-015-1653-8>>.

NAZARETH, T. C. et al. Valorization of the crude glycerol for propionic acid production using an anaerobic fluidized bed reactor with grounded tires as support material. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 2, p. 400–413, 12 out. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-018-2754-y>>.

NGHIEM, L. D. et al. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 160–166, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.023>>.

NGO, T. A.; KIM, M. S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen**

**Energy**, v. 36, n. 10, p. 5836–5842, 2011.

NIZ, M. Y. K. et al. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22876–22887, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>>.

NIZ, M. Y. K. et al. Sugarcane vinasse extreme thermophilic digestion: a glimpse on biogas free management. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02517-7>>.

NJOYA, M. et al. Performance evaluation and kinetic modeling of down-flow high-rate anaerobic bioreactors for poultry slaughterhouse wastewater treatment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9529–9541, 2021.

NUCHDANG, S.; PHALAKORNKULE, C. Anaerobic digestion of glycerol and co-digestion of glycerol and pig manure. **Journal of Environmental Management**, v. 101, p. 164–172, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.031>>.

O-THONG, S. et al. Two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogenic process for biohythane production from palm oil mill effluent with methanogenic effluent recirculation for pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 46, p. 21702–21712, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.095>>.

OLIVEIRA, J. V.; ALVES, M. M.; COSTA, J. C. Optimization of biogas production from *Sargassum* sp. using a design of experiments to assess the co-digestion with glycerol and waste frying oil. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 480–485, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.121>>.

OPPENBERG, B.; SCHINK, B. Anaerobic degradation of 1,3-propanediol by sulfate-reducing and by fermenting bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 57, n. 4, p. 205–213, maio 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00400152>>.

ORDAZ-DIAZ, L. A.; BAILON-SALAS, A. M. Molecular identification of microbial communities in the methane production from vinasse: A review. **BioResources**, v. 15, n. 2, p. 4528–4552, 2020.

OTTAVIANO, L. M. et al. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey

powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4848–4860, 2017.

OZTEMUR, G. et al. Fluidized bed membrane bioreactor achieves high sulfate reduction and filtration performances at moderate temperatures. **Chemosphere**, v. 252, p. 126587, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126587>>.

PACHAPUR, V. L. et al. Valorization of crude glycerol and eggshell biowaste as media components for hydrogen production: A scale-up study using co-culture system. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 386–394, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.114>>.

PACHAPUR, V. L. et al. Seed pretreatment for increased hydrogen production using mixed-culture systems with advantages over pure-culture systems. **Energies**, v. 12, n. 3, p. 1–26, 2019.

PAILLET, F. et al. Improvement of biohydrogen production from glycerol in micro-oxidative environment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 33, p. 17802–17812, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.082>>.

PALACIOS-BERECHE, M. C.; PALACIOS-BERECHE, R.; NEBRA, S. A. Comparison through energy, exergy and economic analyses of two alternatives for the energy exploitation of vinasse. **Energy**, v. 197, p. 117231, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117231>>.

PALACIOS-BERECHE, M. C.; PALACIOS-BERECHE, R.; NEBRA, S. A. Techno-economic evaluation and ghg emission assessment of different options for vinasse treatment and disposal aiming at reducing transport expenses and its energy use. **Bioenergy Research**, v. i, 2021.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, set. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092705>>.

PAP, B. et al. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 375–380, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.021>>.

PARANHOS, A. G. de O.; SILVA, E. L. Optimized 1,3-propanediol production from crude glycerol using mixed cultures in batch and continuous reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 12, p. 1807–1816, 2018.

PARANHOS, A. G. de O.; SILVA, E. L. Statistical optimization of H<sub>2</sub>, 1,3-propanediol and propionic acid production from crude glycerol using an anaerobic fluidized bed reactor: Interaction effects of substrate concentration and hydraulic retention time. **Biomass and Bioenergy**, v. 138, n. April, p. 105575, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105575>>.

PARK, J.-H. et al. Effect of substrate concentration on the competition between *Clostridium* and *Lactobacillus* during biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 25, p. 11460–11469, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.150>>.

PARSAEE, M.; KIANI, M. K. D.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, n. May 2018, p. 117–125, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>>.

PAUDEL, S. et al. Effect of volumetric organic loading rate (OLR) on H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production by two-stage anaerobic co-digestion of food waste and brown water. **Waste Management**, v. 61, p. 484–493, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.013>>.

PAZUCH, F. A. et al. Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. February, p. 34–42, set. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.047>>.

PEREYRA, D. de L. A. D. et al. Co-fermentation of glycerol and molasses for obtaining biofuels and value-added products. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 4, p. 653–660, 2020.

PÉREZ, M.; ROMERO, L. I.; SALES, D. Comparative performance of high rate anaerobic thermophilic technologies treating industrial wastewater. **Water Research**, v. 32, n. 3, p. 559–564, 1998.

PFLÜGL, S. et al. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*.

**Bioresource Technology**, v. 119, p. 133–140, 2012.

PHUKINGNGAM, D. et al. Anaerobic baffled reactor treatment of biodiesel-processing wastewater with high strength of methanol and glycerol: reactor performance and biogas production. **Chemical Papers**, v. 65, n. 5, p. 644–651, jan. 2011.

PIFFER, M. A. et al. Dynamics of sulfate reduction in the thermophilic dark fermentation of sugarcane vinasse: A biohydrogen-independent approach targeting enhanced bioenergy production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105956, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105956>>.

POURESMAEIL, S.; NOSRATI, M.; EBRAHIMI, S. Operating control for enrichment of hydrogen-producing bacteria from anaerobic sludge and kinetic analysis for vinasse inhibition. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103090, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103090>>.

PRAKASH, J. et al. Bio-hydrogen production by co-digestion of domestic wastewater and biodiesel industry effluent. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–11, 2018.

PRASERTSAN, P. et al. Enhanced biogas production by co-digestion of crude glycerol and ethanol with palm oil mill effluent and microbial community analysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 148, n. February, p. 106037, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106037>>.

PREETHI et al. Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. July, p. 100287, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100287>>.

QATIBI, A. I.; BORIES, A.; GARCIA, J. L. Effects of sulfate on lactate and C2-, C3- volatile fatty acid anaerobic degradation by a mixed microbial culture. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 58, n. 4, p. 241–248, 1990.

QUINLAN, A. R.; HALL, I. M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 841–842, 2010.

RAMOS, L. R. et al. Anaerobic digestion of vinasse in fluidized bed reactors: Process robustness between two-stage thermophilic-thermophilic and thermophilic-mesophilic

systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, n. September 2020, 2021.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from agricultural wastewaters at thermophilic and hyperthermophilic temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 2, p. 846–869, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2366-3>>.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 29, p. 13081–13089, 2018.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 8, p. 5239–5251, maio 2020.

RASIT, N. et al. Glycerine supplementation as a recovery strategy of long-chain fatty acids inhibition on anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 7, p. 3325–3336, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1928-z>>.

RAZAVIARANI, V. et al. Pilot scale anaerobic co-digestion of municipal wastewater sludge with biodiesel waste glycerin. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 206–212, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.101>>.

RAZAVIARANI, V.; BUCHANAN, I. D. Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: Microbial community structure dynamics and reactor performance. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 8–17, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.095>>.

REGO, G. C. et al. Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen: new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.

REIS, C. M. dos et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498–8509, 2015.

REN, N. et al. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1112–1125, 2007.

REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 17, p. 6970–6979, 2013.

RIPLEY, A. L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 6, p. 2481–2488, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.006>>.

ROBRA, S. et al. Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 9, p. 1330–1335, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.04.021>>.

RODRIGUES, A.; BORDADO, J. C.; DOS SANTOS, R. G. Upgrading the glycerol from biodiesel production as a source of energy carriers and chemicals - A technological review for three chemical pathways. **Energies**, v. 10, n. 11, 2017.

RODRIGUES, C. V. et al. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 33, p. 14641–14651, 2016.

RODRIGUES, C. V. et al. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 4, p. 144–154, 2019.

RODRIGUES, C. V. et al. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 21, p. 11943–11953, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319920307850>>.

RODRÍGUEZ-ABALDE et al. Characterization of microbial community dynamics during the anaerobic co-digestion of thermally pre-treated slaughterhouse wastes with glycerin addition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 7, p. 1175–1184, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02115-8>>.

RODRÍGUEZ-ABALDE, Á.; FLOTATS, X.; FERNÁNDEZ, B. Optimization of the anaerobic co-digestion of pasteurized slaughterhouse waste, pig slurry and glycerine. **Waste Management**, v. 61, p. 521–528, 2017.

ROMERO-GÜIZA, M. S. et al. Assessment of hyper-thermophilic/mesophilic temperature-phased anaerobic co-digestion of crude glycerine and sewage sludge. **Fuel**, v. 289, n. December 2020, p. 119956, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119956>>.

ROSA, P. R. F. et al. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.088>>.

ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L. A. B. Towards proalcohol II-A review of the Brazilian bioethanol programme. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 2, p. 115–124, 1998.

RUY, A. D. da S. et al. Market prospecting and assessment of the economic potential of glycerol from biodiesel. In: **Biotechnological Applications of Biomass**. [s.l.] IntechOpen, 2020. 1p. 137–144.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

SÁNCHEZ, F. et al. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, n. September 2020, 2021.

SANTOS, A. M. dos et al. Lactate as an effective electron donor in the sulfate reduction: impacts on the microbial diversity. **Environmental Technology**, v. 43, n. 20, p. 3149–3160, 6 set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1916092>>.



SANTOS, P. S. et al. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118005, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118005>>.

SANTOS, S. C. et al. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 55–63, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.051>>.

SANTOS, S. C. et al. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9599–9610, 2014b.

SANTOS, S. C. et al. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 17, p. 9000–9011, jun. 2014c. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319914009690>>.

SARMA, S.; DUBEY, V. K.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and thermodynamic analysis (with statistical optimization) of hydrogen production from crude glycerol using *Clostridium pasteurianum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 44, p. 19972–19989, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.204>>.

SASIDHAR, K. B.; KUMAR, P. S.; XIAO, L. A critical review on the two-stage biohythane production and its viability as a renewable fuel. **Fuel**, v. 317, n. September 2021, p. 123449, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123449>>.

SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 56, p. 29575–29582, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.144>>.

SCHIEVANO, A. et al. Two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion: Comparison of energy production and biodegradation efficiencies. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 15, p. 8502–8510, 2012.

SCHLEIFER, K.-H. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5. In: WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York, Springer New York,

2009. p. 1476.

SCHWINGEL, A. W. et al. Laying hen manure in anaerobic Co-Digestion with glycerin containing different glycerol and impurity levels. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1437–1444, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.125>>.

SEARMSIRIMONGKOL, P. et al. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 20, p. 12810–12821, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.07.080>>.

SEEKAO, N. et al. Co-digestion of palm oil mill effluent with chicken manure and crude glycerol: biochemical methane potential by monod kinetics. **Heliyon**, v. 7, n. 2, p. e06204, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06204>>.

SEKIGUCHI, Y. et al. *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1621–1629, 2006.

SELEMBO, P. A. et al. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098–1106, dez. 2009.

SELMA, V. C. et al. ASBR applied to the treatment of biodiesel production effluent: effect of organic load and fill time on performance and methane production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2365–2380, dez. 2010.

SERRANO, A. et al. Improvement of mesophilic anaerobic co-digestion of agri-food waste by addition of glycerol. **Journal of Environmental Management**, v. 140, p. 76–82, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.02.028>>.

SHIDA, G. M. et al. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 22, p. 16925–16934, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319912019908>>.

SI, B. et al. The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 35, p. 11414–11421, set. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.035>>.

SICA, P. et al. Biogas and biofertilizer from vinasse: making sugarcane ethanol even more sustainable. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 22, n. 5, p. 1427–1433, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10163-020-01029-y>>.

SIDDIQUE, M. N. I.; WAHID, Z. A. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 194, n. 1, p. 359–371, 2018.

SILVA-ILLANES, F. et al. Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. **Energy**, v. 141, p. 358–367, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.09.073>>.

SILVA, A. F. R. et al. Influence of COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ratio on vinasse treatment performance by two-stage anaerobic membrane bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 259, n. January, 2020a.

SILVA, A. B. da et al. Enhanced fermentative production of 1,3-propanediol by employing ethanol industry wastewater. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100865, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100865>>.

SILVA, F. M. S. et al. Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 36, p. 22720–22729, 2017.

SILVA, F. M. S. et al. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339–349, 2018.

SILVA, M. C. de A. et al. Evaluation of semi-continuous operation to hydrogen and volatile fatty acids production using raw glycerol as substrate. **Renewable Energy**, v. 153, p. 701–710, 2020b.

SILVESTRE, G.; FERNÁNDEZ, B.; BONMATÍ, A. Addition of crude glycerine as strategy to balance the C/N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 377–385, 2015.

SIMÕES, A. N. et al. One waste and two products: choosing the best operational temperature and hydraulic retention time to recover hydrogen or 1,3-propanediol from glycerol fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 0123456789, 13 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02620-9>>.

SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S. G.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 48, n. 13, p. 1707–1716, 2013a.

SITTIJUNDA, S. et al. Two-stage anaerobic codigestion of crude glycerol and micro-algal biomass for biohydrogen and methane production by anaerobic sludge consortium. **Fermentation**, v. 7, n. 3, 2021.

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

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Fermentation of hydrogen, 1,3-propanediol and ethanol from glycerol as affected by organic loading rate using up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27558–27569, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.149>>.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Valorization of crude glycerol into hydrogen, 1,3-propanediol, and ethanol in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor under thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 161, p. 361–372, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.07.053>>.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Methane production from the co-digestion of algal biomass with crude glycerol by anaerobic mixed cultures. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 5, p. 1873–1881, 2020b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0542-0>>.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>>.

SOSA-VILLALOBOS, C. et al. Influence of hydraulic retention time in the treatment of cane alcohol vinasse by UASB reactor. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 17, n. 3, p. 987–992, 2018.

SOUZA, M. E.; FUZARO, G.; POLEGATO, A. R. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. **Wat. Sci. Tech.**, v. 25, n. 7, p. 213–222, 1992.

STEVENS, M. J. A. et al. 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: Impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1–9, 2011.

SUN, Y. Q. et al. Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. **Process Biochemistry**, v. 71, n. December 2017, p. 134–146, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.009>>.

SYDNEY, E. B. et al. Current developments and challenges of green technologies for the valorization of liquid, solid, and gaseous wastes from sugarcane ethanol production. **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, n. April 2020, 2021.

T.A.S, J. et al. Anaerobic mono and co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and landfill leachate at industrial scale: Impact of volatile organic loading rate on reaction kinetics, biogas yield and microbial diversity. **Science of the Total Environment**, v. 748, p. 142462, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142462>>.

TAKEDA, P. Y. et al. Enhancing the energetic potential of sugarcane biorefinery exchanging vinasse and glycerol in sugarcane off-season in an anaerobic reactor. v. 195, 2022.

TAMAMES, J.; PUENTE-SÁNCHEZ, F. SqueezeMeta, a highly portable, fully automatic metagenomic analysis pipeline. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–10, 2019.

TANGKATHITIPONG, P. et al. Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR). **Renewable Energy**, v. 113, p. 1077–1085, 2017.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49–58, 1996.

TENA, M.; PEREZ, M.; SOLERA, R. Benefits in the valorization of sewage sludge and wine vinasse via a two-stage acidogenic-thermophilic and methanogenic-mesophilic system based on the circular economy concept. **Fuel**, v. 296, n. February, p. 120654, 2021a. Disponible em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120654>>.

TENA, M.; PEREZ, M.; SOLERA, R. Effect of hydraulic retention time on the methanogenic step of a two-stage anaerobic digestion system from sewage sludge and wine vinasse: Microbial and kinetic evaluation. **Fuel**, v. 296, n. December 2020, p. 120674, 2021b. Disponible em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120674>>.

TOLEDO-ALARCÓN, J. et al. Impact of the microbial inoculum source on pre-treatment efficiency for fermentative H<sub>2</sub> production from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 3, p. 1597–1607, 2020.

TOLEDO-CERVANTES, A. et al. Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 12–20, 2018. Disponible em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.020>>.

TRCHOUNIAN, K.; POLADYAN, A.; TRCHOUNIAN, A. Optimizing strategy for *Escherichia coli* growth and hydrogen production during glycerol fermentation in batch culture: Effects of some heavy metal ions and their mixtures. **Applied Energy**, v. 177, p. 335–340, 2016. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.05.129>>.

VAN HAANDEL, A. et al. Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1751–1759, 2014.

VASCONCELOS, E. A. F. et al. Composition and ecology of bacterial and archaeal communities in anaerobic reactor fed with residual glycerol. **Anaerobe**, v. 59, p. 145–153, 2019.

VÁSQUEZ, J.; NAKASAKI, K. Effects of shock loading versus stepwise acclimation on

microbial consortia during the anaerobic digestion of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 86, p. 129–135, 2016.

VÁSQUEZ, J.; NAKASAKI, K. Effects of acclimated sludge used as seeding material in the start-up of anaerobic digestion of glycerol. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 20, n. 1, p. 185–192, 2018.

VERAS, S. T. S. et al. Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using a UASB reactor with attached biomass in silicone support. **Bioresource Technology**, v. 279, n. January, p. 140–148, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.125>>.

VERAS, S. T. S. et al. Anaerobic production of valeric acid from crude glycerol via chain elongation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 1847–1858, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13762-019-02562-6>>.

VIANA, M. B. et al. Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 10, p. 2217–2222, nov. 2012.

VIANA, M. B. et al. The source of inoculum and the method of methanogenesis inhibition can affect biological hydrogen production from crude glycerol. **Bioenergy Research**, p. 733–742, 2019.

VIEIRA, P. B. et al. Process strategies for enhanced production of 1,3-propanediol by *Lactobacillus reuteri* using glycerol as a co-substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 30–38, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.003>>.

VILELA, R. S. et al. Biofuel production from sugarcane molasses in thermophilic anaerobic structured-bed reactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, n. April 2020, p. 110974, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110974>>.

MONTOYA, A. C. et al. Optimization of key factors affecting hydrogen production from coffee waste using factorial design and metagenomic analysis of the microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 7, p. 4205–4222, 2020.

VIVEK, N. et al. Pentose rich acid pretreated liquor as co-substrate for 1,3-propanediol production. **Renewable Energy**, v. 129, p. 794–799, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.01.055>>.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 222–230, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.020>>.

VLASSIS, T. et al. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: a comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. n/a-n/a, abr. 2013.

VLISSIDIS, A.; ZOUBOULIS, A. I. Thermophilic anaerobic digestion of alcohol distillery wastewater. **Bioresource Technology**, v. 43, n. 1, p. 131–140, 1993.

WAINAINA, S. et al. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. **Bioengineered**, v. 10, n. 1, p. 437–458, 2019.

WALKER, M. et al. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6339–6346, dez. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.018>>.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 2, p. 799–811, jan. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>>.

WANG, Y. et al. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 5, p. 848–853, maio 2009.

WANG, Z. et al. Enhancing energy recovery via two stage co-fermentation of hydrothermal liquefaction aqueous phase and crude glycerol. **Energy Conversion and Management**, v. 231, n. February, p. 113855, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.113855>>.

WEIDE, T. et al. Comparison of thermophilic and hyperthermophilic dark fermentation with subsequent mesophilic methanogenesis in expanded granular sludge bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 57, p. 29142-29159, 2020.

WESTERHOLM, M. et al. Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 4, p. 500–505, 2011.



WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63–102, ago. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953400000179>>.

WON, S. G. et al. Optimal operational conditions for biohydrogen production from sugar refinery wastewater in an ASBR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 32, p. 13895–13906, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.071>>.

XIAO, B. et al. Comparison of single-stage and two-stage thermophilic anaerobic digestion of food waste: Performance, energy balance and reaction process. **Energy Conversion and Management**, v. 156, n. August 2017, p. 215–223, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.10.092>>.

XIE, S. et al. Current status and perspectives on anaerobic co-digestion and associated downstream processes. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 4, n. 11, p. 1759–1770, 2018.

XIU, Z. L. et al. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, n. 1, p. 42–52, 2007.

YAMANE, O; KOMIYAMA, M. Hydrogen production by anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel fuel manufacturing process – Part I. inoculum characteristics and the effect of crude glycerol. **International Journal of Biomass & Renewables**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2017.

YANG, X. et al. Improved production of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, n. May, p. 25–36, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.042>>.

YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 362–367, abr. 2008.

YESHANEW, M. M. et al. Start-up of an anaerobic fluidized bed reactor treating synthetic carbohydrate rich wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 184, p. 456–464,

2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.10.001>>.

YUN, J. et al. Co-fermentation of glycerol and glucose by a co-culture system of engineered *Escherichia coli* strains for 1,3-propanediol production without vitamin B<sub>12</sub> supplementation. **Bioresource Technology**, v. 319, n. October 2020, p. 124218, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124218>>.

ZAHEDI, S. et al. Changes in microbial community during hydrogen and methane production in two-stage thermophilic anaerobic co-digestion process from biowaste. **Waste Management**, v. 49, p. 40–46, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.016>>.

ZAHEDI, S. et al. Bioenergy generation from municipal solid waste and glycerin waste: population dynamics. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 9, p. 9550–9556, 2017.

ZAHEDI, S. et al. Mesophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge with glycerine: Effect of solids retention time. **Fuel**, v. 215, n. January 2017, p. 285–289, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.007>>.

ZHANG, F. et al. Simultaneous production of acetate and methane from glycerol by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens in extreme-thermophilic (70 °C) mixed culture fermentation. **Applied Energy**, v. 148, p. 326–333, jun. 2015.

ZHANG, J. et al. Mixing strategies – Activated carbon nexus: Rapid start-up of thermophilic anaerobic digestion with the mesophilic anaerobic sludge as inoculum. **Bioresource Technology**, v. 310, n. April, p. 123401, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123401>>.

ZHANG, L. et al. Methane yield enhancement of mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of algal biomass and food waste using algal biochar: Semi-continuous operation and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 302, n. January, p. 122892, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122892>>.

ZHANG, Y. et al. Startup and operation of anaerobic reactor treating palm oil mill effluent. **Journal of environmental science**, v. 20, p. 658–663, 2008.

ZHANG, Y. et al. Co-digestion of microalgae with potato processing waste and glycerol: Effect of glycerol addition on methane production and the microbial community. **RSC Advances**, v.

10, n. 61, p. 37391–37408, 2020c.

ZHANG, Y. et al. Notable Improvement of 3-Hydroxypropionic Acid and 1,3-Propanediol Coproduction Using Modular Coculture Engineering and Pathway Rebalancing. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 12, p. 4625–4637, 2021.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHU, Y. et al. Current advances in microbial production of 1,3-propanediol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, n. 30, p. 1–18, 2021.

## ANEXO A- BALANÇO DE DQO DOS RALF

Tabela A1. Balanço de massa do RALF-MT

Etapa	Verificação			Glic <sub>efflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	C <sub>efflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SSV	DQO <sub>Σ</sub>	DQO <sub>medida</sub>	≠
	HPr	HAc	HBu							
1	0	0	0	57	33	0	97	187	435	-57%
2	0	0	0	79	41	0	89	209	386	-46%
3	0	0	0	82	58	0	193	333	607	-45%
4	1091	0	143	79	161	117	378	1970	2642	-25%
5	1057	0	0	97	162	0	458	1774	2354	-25%
6	586	0	0	94	146	0	588	1415	2170	-35%
7	1901	510	0	117	220	0	1306	4054	4746	-15%
8	0	0	102	96	171	0	643	1013	1296	-22%
9	487	172	303	105	235	0	407	1710	1799	-5%

Tabela A2. Balanço de massa do RALF-AT

Etapa	Verificação								Glic <sub>efflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	C <sub>efflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SSV	DQO <sub>Σ</sub>	DQO <sub>medida</sub>	≠
	HLa	HPr	HAc	EtOH	HIsoBu	HBu	HVal	1,3-PDO							
1	139	347	277	139	0	689	0	1951	3020	365	0	376	7302	10783	-32%
2	155	166	199	0	569	1344	0	1903	8014	831	0	427	13607	14851	-8%
3	56	1267	421	0	0	4763	1657	0	10650	1183	0	1204	21202	21637	-2%
4	98	105	389	0	0	90	0	1983	4927	732	0	275	8599	9639	-11%
5	99	48	192	0	0	98	0	1595	5379	1050	0	276	8737	10289	-15%

Tabela A3. Balanço de massa do RALF-ST

Etapa	Verificação			Glic <sub>eflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	C <sub>eflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SSV	DQO <sub>Σ</sub>	DQO <sub>medida</sub>	≠
	HPr	HAc	HBu							
1	0	0	0	57	44	0	31	131	272	-52%
2	0	0	0	62	46	0	66	173	411	-58%
3	0	0	0	63	84	0	153	299	871	-66%
4	250	338	143	100	124	508	521	1984	1889	5%
5	652	0	0	167	207	0	423	1449	2140	-32%
6	1318	783	0	113	216	0	844	3274	4367	-25%
7	0	0	62	100	221	0	717	1100	1659	-34%
8	223	124	401	110	254	0	440	1551	2206	-30%

Tabela A4. Balanço de massa do RALF-SM

Etapa	Verificação			Glic <sub>eflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	C <sub>eflu</sub> (g L <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SSV	DQO <sub>Σ</sub>	DQO <sub>medida</sub>	≠
	HPr	HAc	HBu							
1	0	0	0	50	34	0	13	96	188	-49%
2	0	0	0	57	28	0	6	91	166	-45%
3	0	0	0	63	45	0	91	199	463	-57%
4	358	182	0	89	124	373	296	1423	1499	-5%
5	1545	399	0	96	195	0	322	2557	3111	-18%
6	2495	441	0	100	158	0	1029	4222	6693	-37%
7	481	433	191	95	187	0	727	2114	2043	3%
8	831	482	282	99	177	0	310	2180	2566	-15%