



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ISABELA BRUNA DE TAVARES MACHADO BOLONHESI

**VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DOS RESÍDUOS DO  
PROCESSAMENTO DA MANDIOCA EM SISTEMA  
ANAERÓBIO OPERADO EM DUAS FASES COM  
IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM MATERIAL  
LIGNOCELULÓSICO**

---

Londrina  
2022

ISABELA BRUNA DE TAVARES MACHADO BOLONHESI

**VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DOS RESÍDUOS DO  
PROCESSAMENTO DA MANDIOCA EM SISTEMA  
ANAERÓBIO OPERADO EM DUAS FASES COM  
IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM MATERIAL  
LIGNOCELULÓSICO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina – Centro de Tecnologia e Urbanismo – Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil para obtenção do título de doutora em Engenharia Civil.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deize Dias Lopes  
Coorientador: Dr<sup>a</sup> Cristiane Lurdes Andreani

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B693v Bolonhesi, Isabela Bruna de Tavares Machado .  
VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA EM SISTEMA ANAERÓBIO OPERADO EM DUAS FASES COM IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM MATERIAL LIGNOCELULÓSICO / Isabela Bruna de Tavares Machado Bolonhesi. - Londrina, 2022.  
200 f. : il.

Orientador: Deize Dias Lopes.

Coorientador: Cristiane Lurdes Andreani.

Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Tecnologia e Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2022.

Inclui bibliografia.

1. codigestão anaeróbia - Tese. 2. hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos - Tese. 3. biocarvão - Tese. 4. produção de biogás a partir de resíduos agroindustriais - Tese. I. Dias Lopes, Deize . II. Andreani, Cristiane Lurdes . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Tecnologia e Urbanismo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. IV. Título.

CDU 62

ISABELA BRUNA DE TAVARES MACHADO BOLONHESI

**VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DOS RESÍDUOS DO  
PROCESSAMENTO DA MANDIOCA EM SISTEMA  
ANAERÓBIO OPERADO EM DUAS FASES COM  
IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM MATERIAL  
LIGNOCELULÓSICO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina – Centro de Tecnologia e Urbanismo – Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil para obtenção do título de doutora em Engenharia Civil.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Deize Dias Lopes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues  
Instituto Mauá de Tecnologia - IMT

---

Dr. Lucas Tadeu Fuess  
University of Ireland Galway

---

Prof. Dr. Marcelo Zaiat  
Escola de Engenharia de São Carlos - EESC

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Simone Damasceno Gomes  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
UNIOESTE

Londrina, 11 de abril de 2022.

*À minha família, com amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre criar as oportunidades necessárias para alcançar o que almejo.

À minha família por todo apoio. Às minhas irmãs, Gabriela e Giovanna, que tanto torceram por mim. Agradeço em especial aos meus pais, Vera e Gonçalo, que são exemplos de amor e profissionalismo, por sempre insistirem na minha formação acadêmica. Obrigada por tanto! Serei a primeira doutora da família e esse título não será só meu.

Ao meu marido Maurilio, que acompanha minha “saga acadêmica” desde a graduação, pós-graduação, mestrado e agora doutorado. Esteve comigo em tantas decisões importantes, além de coletas, análises, idas ao laboratório durante a pandemia, e deixou de lado alguns de seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu de ser doutora. Obrigada pela parceria, cuidado e dedicação!

Às minhas orientadoras, professora Deize Dias Lopes e Cristiane Andreani por toda troca de experiências ao longo do doutorado.

Aos membros da banca pelo aceite ao convite e dispêndio de tempo com meu trabalho.

Aos professores Adriana Lourenço Soares Russo e Marcelo Rodrigues de Melo dos Departamentos de Alimentos e de Bioquímica e Biotecnologia da UEL, que possibilitaram que esse trabalho se concretizasse ao emprestarem seus cromatógrafos para as análises de biogás e dos metabólitos solúveis, em pleno início e pico da pandemia. Obrigada professores, por serem tão generosos, empáticos e exemplos de grandes profissionais. Aproveito para agradecer às alunas Fernanda e Ana, orientadas pela professora Adriana, pela disponibilidade em abrir o laboratório de alimentos e me auxiliar no manuseio do equipamento.

Ao doutor Ismael, que, sem me conhecer, aceitou por meio de um telefonema me ajudar a elaborar a metodologia de análise cromatográfica do biogás. Obrigada por sua gentileza, generosidade e simpatia. Aprendi muito contigo.

À técnica Tânia do Laboratório de Zootecnia da UEL, por todo auxílio nas análises de lignina e celulose.

Aos técnicos Osvaldo e Marcos do Laboratório Multiusuários da UEL, pela atenção, cuidado e ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Às técnicas Aline e Natalia do Laboratório de Espectroscopia da UEL, que compartilharam comigo seus conhecimentos no processamento das amostras para espectroscopia infravermelha.

Ao professor Luis Henrique Dall'Antoni do departamento de Química da UEL e ao aluno de doutorado Luan Camargo, que emprestaram materiais e equipamentos que tornaram esse trabalho possível, além de todo suporte nas análises de caracterização do biocarvão. Reforço que sem a colaboração de vocês esse trabalho não seria possível.

À professora Raquel e seus alunos de pós-graduação, que gentilmente compartilharam equipamentos e cederam, inclusive, água destilada para realização de inúmeras análises.

Ao professor Janksyn Bertozzi do Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná por compartilhar seus conhecimentos para a produção do biocarvão. Sua orientação foi essencial para que o tão desejado e planejado biocarvão pudesse ser produzido.

Ao Sr. Marcos Borges, ao Fernando e à empresa de fecularia de mandioca, que possibilitaram a coleta dos lotes de água residuária utilizados neste estudo.

À professora Simone Damasceno Gomes e sua aluna de doutorado Tamires Tonello da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, que compartilharam experiências, cederam seu tempo e equipamentos para as análises primárias desse estudo.

À professora Katia Valéria Marques Cardoso Prates do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, com quem iniciei minha vida científica e que tanto me apoiou para que eu continuasse minha carreira acadêmica.

Às diversas organizações privadas e seus colaboradores, que contribuíram na execução de algumas das análises apresentadas neste estudo.

Aos alunos do Laboratório de Saneamento e colegas de pós-graduação Adriana, Jéssica, Thainara, Priscila, Isabela e Maurício por toda colaboração, desde empréstimos de equipamentos até troca de ideias, experiências e conversas.

Ao técnico de Laboratório de Saneamento, Sr. Ivan e ao técnico do laboratório de Maquetes, Sr. Carlos, pelo auxílio na adaptação de materiais e equipamentos.

Aos companheiros do Laboratório de Saneamento da UEL, Caio, Marisa, Camila e Suellen pela companhia, risadas, choros, aprendizados e por tudo o que passamos juntos. Fazer ciência no Brasil é um ato de resistência, e meus amigos, nós resistimos!

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal e de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado.

Por fim, agradeço às inúmeras pessoas que dividiram seu tempo comigo e me ajudaram nesses últimos quatro anos. Sou muito grata por cada pequena ajuda que possibilitou concretizar essa pesquisa.

Muito obrigada.

*“Mas eu sei bem em quem tenho acreditado.  
E estou bem certo que Ele é poderoso para guardar  
meu tesouro até o dia apropriado de  
entregar-me.” (São Paulo)*

BOLONHESI, Isabela Bruna de Tavares Machado. **Valorização energética dos resíduos do processamento da mandioca em sistema anaeróbio operado em duas fases com imobilização celular em material lignocelulósico**. 2022. 199 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

Esse estudo teve como objetivo avaliar a digestão anaeróbia em duas fases da água residuária de fecularia de mandioca (ARFM) em reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) na rama de mandioca. Para favorecer a adesão dos microrganismos, a rama de mandioca foi submetida à hidrólise ácida e a vapor. O pré-tratamento por hidrólise ácida foi selecionado para a preparação da rama na imobilização celular dos reatores acidogênico e metanogênico. No reator acidogênico, alimentado com a ARFM (concentração afluyente fixa em  $5\text{gCarb L}^{-1}$ ), foram avaliadas duas condições operacionais, nas quais foram contemplados o aumento da carga orgânica volumétrica (COV, de 11 para  $15\text{gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) atrelado à diminuição do tempo de ciclo (TC, de 4 para 3 h). O reator metanogênico foi alimentado com o efluente do reator acidogênico (concentração afluyente fixa em  $5\text{gDQO L}^{-1}$ ). Seu desempenho foi avaliado em função do aumento da COV (4; 8; 12;  $16\text{gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) com a redução do TC (24; 12; 8 e 6 h). Para otimizar a produção de metano, adicionalmente, foram realizados testes em bateladas considerando a adição de diferentes concentrações de biocarvão (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e  $6,0\text{g L}^{-1}$ ). A dosagem que apresentou o melhor resultado, em termos de produção de metano, foi posteriormente adicionada ao reator metanogênico. Nessa etapa, o comportamento do AnSBBR metanogênico foi novamente avaliado quanto ao aumento da COV (8; 12;  $16\text{gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e a diminuição do TC (12; 8 e 6 h). Verificou-se que o tratamento das ramas de mandioca via hidrólise ácida apresentou as melhores eficiências de conversão da estrutura lignocelulósica em celulose (50%) e conversão de carboidratos (97%), sendo utilizada na imobilização celular dos reatores acidogênico e metanogênico. O reator acidogênico apresentou produção volumétrica de hidrogênio e rendimento máximos de  $1,48\text{LH}_2\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $1,98\text{molH}_2\text{kg}^{-1}\text{Carb (COV } 15\text{gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}\text{ e TC de 3 h)}$ , com predominância de microrganismos produtores de hidrogênio, como os gêneros *Clostridium* e *Hydrogenispora*. No reator metanogênico operado sem adição de biocarvão, a maior produção volumétrica ( $3,74\pm 0,72\text{LCH}_4\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e rendimento de metano ( $0,270\pm 0,05\text{LCH}_4\text{gDQO}^{-1}$ ) foram obtidos para a maior COV ( $16\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e menor TC (6 h) testados. No entanto, o aumento da COV de 4 para  $16\text{gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a diminuição do TC de 24 para 6 h reduziram a eficiência de remoção de matéria orgânica de 99% para 67%. Entre os testes com diferentes dosagens de biocarvão, a adição de  $2\text{g L}^{-1}$  apresentou o melhor resultado em termos de produção de metano ( $1,33\text{LCH}_4\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e eficiência de remoção de matéria orgânica (96%), sendo essa a dosagem posteriormente aplicada ao reator metanogênico. Nos ensaios conduzidos com biocarvão no AnSBBR metanogênico, houve aumento médio de 26% na produção volumétrica ( $4,06\text{LCH}_4\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e no rendimento de metano ( $0,301\text{LCH}_4\text{gDQO}^{-1}$ ). Além disso, os resultados indicam que a adição desse material ao reator metanogênico pode enriquecer a digestão anaeróbia com microrganismos eletroativos, como os gêneros *Anaerolinea*, *Syntrophomonas*, *Pseudomonas* e *Sedimentibacter* em conjunto com as arqueas *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, possibilitando eficiências de remoção de matéria orgânica elevadas (85%) em todas as condições operacionais testadas. Nas melhores condições operacionais avaliadas, o sistema em duas fases proveu produção de hidrogênio e metano em um tempo total de operação de 9 h (3h para o reator acidogênico e 6 h para o reator metanogênico). Dessa forma, constatou-se que as estratégias de separação da digestão

anaeróbia em duas fases, imobilização celular na rama de mandioca e sua utilização como cosubstrato, bem como a adição de biocarvão ao reator metanogênico, proporcionaram o aproveitamento energético dos resíduos de processamento da mandioca, com produção de energia de até  $159,12 \text{ kJ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** hidrólise; rama de mandioca; resíduos agroindustriais; fermentação; codigestão anaeróbia; biocarvão.

BOLONHESI, Isabela Bruna de Tavares Machado. **Cassava processing residues energy recovery in a two-phase anaerobic system with cell immobilization in lignocellulosic material**, 2022. 199 p. Thesis (Doctoral in Civil Engineering) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the two-phase cassava starch wastewater anaerobic digestion in an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) using cassava stem (CS) as support material. To favor the microorganism adhesion to the support material, the cassava stem was subjected to acid and steam hydrolysis. The best pre-treatment was used in the material preparation to the cell immobilization of acidogenic and methanogenic reactors. The acidogenic reactor was fed with cassava starch wastewater (influent concentration fixed at 5 gCarb L<sup>-1</sup>). Its performance was evaluated according to the increase in the organic load rate (OLR) from 11 to 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and to the cycle time (CT) reduction (4 and 3 h). The methanogenic reactor was fed with the effluent from the acidogenic reactor (influent concentration fixed at 5 gCOD L<sup>-1</sup>). The reactor performance was evaluated as OLR function (4; 8; 12; 16 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and CT reduction (24; 12; 8 e 6 h). To optimize methane production, tests were carried out in batches considering the different concentrations of biochar addition (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 6,0 g L<sup>-1</sup>). The best dosage, in terms of methane production, was later added to the methanogenic reactor. At this stage, the system behavior was evaluated regarding the increase in OLR (8; 12; 16 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and CT (12; 8; 6 h). The best conversion efficiencies were verified in the CS subjected to acid hydrolysis, considering cellulose (50%) and carbohydrate conversion (97%), being used in the cellular immobilization of acidogenic and methanogenic reactors. The acidogenic reactor showed hydrogen volumetric production until 1.4 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and hydrogen yield until 1.98 molH<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>Carb (OLR 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and CT 3 h), with a predominance of hydrogen-producing microorganisms such as *Clostridium* and *Hydrogenispora*. In the methanogenic reactor, volumetric methane production until 3.74±0.72 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> and methane yield until 0.270±0.05 LCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup> were verified for the highest OLR (16 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and lowest cycle time (6 h) tested. The increase in OLR reduced the organic matter removal efficiency from 99% to 65%, due to the increased of organic matter and reduced cycle time. Among tests with different dosages of biochar, the 2 gbiochar L<sup>-1</sup> addition showed the best result in terms of methane production (1.33 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and organic matter removal efficiency (96%), which is the dosage subsequently applied to the methanogenic reactor. In assays conducted with biochar in the methanogenic AnSBBR, there was a 26% increase in volumetric production (4.06 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and methane yield (0.301 LCH<sub>4</sub> gCOD<sup>-1</sup>). In addition, the results suggest that the biochar addition to the methanogenic reactor can enrich the anaerobic digestion with electroactive microorganisms, such as *Anaerolinea*, *Syntrophomonas*, *Pseudomonas* and *Sedimentibacter* genera with the archaea *Methanosaeta* and *Methanosarcina*, enabling high organic matter removal efficiencies (85%). The two-phase system generated an energy production (hydrogen and methane) to the best operational conditions evaluated, with a total operating time of 9 h (3 h for the acidogenic reactor and 6 h for the methanogenic reactor). The anaerobic digestion separation in two phases, the cell immobilization in the cassava branch and its use as a cosubstrate and the addition of biochar to the methanogenic reactor provided the energetic use of cassava processing residues, with energy production rate of 159.12 kJ L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

**Key words:** hydrolysis; cassava stem; agroindustrial residues; fermentation; anaerobic codigestion; biochar.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Caracterização físico-química da água residuária do processamento de mandioca .....	28
<b>Tabela 2</b> -	Desempenho de reatores anaeróbios de fase única destinados à produção de hidrogênio ou metano .....	31
<b>Tabela 3</b> -	Desempenho de reatores anaeróbios em duas fases destinados a produção de hidrogênio ou metano (continua) .....	32
<b>Tabela 4</b> -	Estudos comparativos com ARFM para produção de hidrogênio. ....	46
<b>Tabela 5</b> -	Composição do biogás gerado a partir da DA em condições favoráveis à produção de CH <sub>4</sub> .....	47
<b>Tabela 6</b> -	Estudos comparativos com ARFM para produção de metano .....	52
<b>Tabela 7</b> -	Composição da ARFM bruta .....	61
<b>Tabela 8</b> -	Resumo das condições experimentais para produção de hidrogênio na fase acidogênica .....	61
<b>Tabela 9</b> -	Caracterização do efluente do reator acidogênico .....	64
<b>Tabela 10</b> -	Resumo das condições experimentais do AnSBBR metanogênico .....	64
<b>Tabela 11</b> -	Resumo das condições experimentais dos ensaios com adição de biocarvão.....	66
<b>Tabela 12</b> -	Resumo das condições experimentais do AnSBBR metanogênico com adição de biocarvão.....	68
<b>Tabela 13</b> -	Caracterização da composição lignocelulósica da rama da mandioca antes e após os tratamentos .....	78
<b>Tabela 14</b> -	Parâmetros de estabilidade operacional e eficiência do AnSBBR acidogênico .....	85
<b>Tabela 15</b> -	Comparativo da produção de hidrogênio entre estudos que utilizaram a ARFM como substrato .....	90
<b>Tabela 16</b> -	Degradação da estrutura lignocelulósica e teor de proteína na CS ao longo dos ensaios acidogênicos .....	93
<b>Tabela 17</b> -	Indicadores de monitoramento do AnSBBR metanogênico para as condições testadas .....	102
<b>Tabela 18</b> -	Concentração média dos metabólitos solúveis presentes no efluente do reator metanogênico .....	106

<b>Tabela 19</b> -	Variações na carga orgânica aplicada e específica do reator AnSBBR metanogênico .....	110
<b>Tabela 20</b> -	Estudos com foco na obtenção de metano a partir de efluentes gerados no processamento da mandioca em sistemas de duas fases .....	112
<b>Tabela 21</b> -	Desempenho do reator AnSBBR em relação à produção de metano.....	114
<b>Tabela 22</b> -	Comparativo entre pesquisas quanto à produção energética a partir de efluente de fecularia de mandioca.....	116
<b>Tabela 23</b> -	Degradação da rama de mandioca ao longo do experimento metanogênico .....	122
<b>Tabela 24</b> -	Análise da composição elementar da rama de mandioca e do biocarvão	126
<b>Tabela 25</b> -	Parâmetros das isotermas de Langmuir e Freundlich na adsorção de matéria orgânica.....	131
<b>Tabela 26</b> -	Indicadores de monitoramento do AnSBBR metanogênico para as condições testadas com adição de BC .....	141
<b>Tabela 27</b> -	Concentração média dos metabólitos presentes no efluente dos ensaios V, VI e VII .....	143
<b>Tabela 28</b> -	Desempenho do reator AnSBBR em relação à produção de metano antes e depois da adição de BC.....	149
<b>Tabela 29</b> -	Comparativo entre estudos de sistemas em duas fases quanto à produção energética .....	151
<b>Tabela 30</b> -	Comparativo entre tipos de biocarvão, condições experimentais e principais resultados da adição de BC na digestão anaeróbia.....	152
<b>Tabela 31</b> -	Composição da CS in natura e ao término dos ensaios V ao VII* .....	154
<b>Tabela 32</b> -	Concentração de nutrientes presentes no efluente dos reatores das Fases II, III e V .....	156

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Fluxograma industrial do processamento da mandioca para extração de fécula.....	27
<b>Figura 2</b> -	Possíveis rotas metabólicas dos microrganismos dos gêneros Clostridium e Enterobacter para a produção de biohidrogênio .....	40
<b>Figura 3</b> -	Fases desenvolvidas ao longo do experimento .....	57
<b>Figura 4</b> -	Rama de mandioca: a) in natura; b) após a hidrólise ácida; c) após a hidrólise a vapor.....	58
<b>Figura 5</b> -	Esquema do reator acidogênico – a) Sistema de incubação; b) Reator acidogênico .....	60
<b>Figura 6</b> -	Sistema metanogênico:1. Reservatório do afluente; 2. Bomba de alimentação; 3. AnSBBR; 4. Sistema de agitação; 5. Bomba de descarga; 6. Reservatório do efluente; 7. Painel de controle para acionamento automático das bombas e do sistema de agitação; 8. Gasômetro; 9. Refrigerador .....	62
<b>Figura 7</b> -	1. Sistema de aquecimento do reator; 2. Sistema de agitação; 3. Controle do sistema de agitação; 4. Vista do reator metanogênico e do cesto de aço inox.....	63
<b>Figura 8</b> -	Esquema do sistema de produção do biocarvão: a) reator; b) reator alocado na parte interna da mufla conectado ao cilindro de N <sub>2</sub> ; c) imagem interna da mufla; d) mufla fechada com reator conectado ao cilindro de N <sub>2</sub> .....	65
<b>Figura 9</b> -	Perfis de a) pH; b) consumo de DQO; c) consumo de carboidratos; e d) PVH nos ensaios NH – Nenhuma hidrólise; AH – hidrólise ácida; VH – hidrólise no vapor e C – Controle.....	80
<b>Figura 10</b> -	Proporção de metabólitos solúveis nos ensaios AH, VH, NH e Controle .....	81
<b>Figura 11</b> -	MEV da CS e do biofilme: a) NH; b) biofilme em NH; c) VH; d) biofilme em VH; e) AH; f) biofilme em AH; g) morfologia do biofilme em AH; h) microrganismos aderidos às paredes internas e externas de AH.....	83
<b>Figura 12</b> -	Proporção de metabólitos solúveis nos ensaios I e II .....	86

<b>Figura 13</b> -	Produção volumétrica (PVH) e rendimento (HY) de hidrogênio ao longo do ensaio I (11 gCarb L-1d-1 e TC de 4h) e ensaio II (15 gCarb L-1d-1 e TC de 3h) .....	88
<b>Figura 14</b> -	Rama de mandioca hidrolisada no início (a) e ao término (b) do período de operação do RA.....	92
<b>Figura 15</b> -	a) Análise dos grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da CS in natura (AM 1), após hidrólise ácida (AM 2) e ao final de operação do reator (AM 3); b) identificação dos sinais evidenciados na análise FT-IR, c) DRX das amostras AM1 e AM3.....	95
<b>Figura 16</b> -	MEV da CS e biofilme do reator acidogênico: (a): COV 11 gCarb L-1d-1 e (b): COV 15 gCarb L-1d-1 .....	98
<b>Figura 17</b> -	Abundância relativa de bactérias: a) filo; b) gênero .....	99
<b>Figura 18</b> -	Variação temporal do pH, acidez total, alcalinidade, AI/AP e AV/AT no reator metanogênico.....	103
<b>Figura 19</b> -	Variação temporal nas concentrações de SVT e SSV do efluente metanogênico ao longo do experimento .....	108
<b>Figura 20</b> -	Remoção de matéria orgânica ao longo dos experimentos I a IV: a) DQO - DQO total do efluente; EDQO - eficiência de remoção DQO total; b) DQOf - DQO filtrada do efluente; EDQOf - eficiência de remoção DQO filtrada.....	109
<b>Figura 21</b> -	Produção volumétrica e rendimento de metano por carga removida.....	115
<b>Figura 22</b> -	MEV do biofilme metanogênico.....	120
<b>Figura 23</b> -	Estrutura da CS no início (a) e ao término (b) do período operacional metanogênico .....	121
<b>Figura 24</b> -	Análise Termogravimétrica do lodo e do material de imobilização do reator acidogênico.....	124
<b>Figura 25</b> -	Ponto isoelétrico do biocarvão (a linha tracejada em vermelho indica os valores médios do pH que tendem a um mesmo valor, obtendo-se o ponto isoelétrico) .....	127
<b>Figura 26</b> -	a) Curva de distribuição dos poros do BC; b) Isotermas de adsorção e dessorção de N <sub>2</sub> do BC.....	128
<b>Figura 27</b> -	Análise dos grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) do biocarvão; .....	129

<b>Figura 28</b> -	Produção volumétrica de metano para as condições i (TC 12h e COV de 8 gDQO L-1d-1) e ii (TC de 8 h e COV de 16 gDQO L-1d-1), sendo C o ensaio controle (sem biocarvão) e T os ensaios com adição de biocarvão.....	132
<b>Figura 29</b> -	Concentração de metabólitos solúveis no efluente final dos ensaios T1 (0,5 g L-1); T2 (1,0 g L-1); T3 (1,5 g L-1); T4 (2,0 g L-1); T5 (3,0 g L-1) e T6 (6,0 g L-1) e Controle (C); e eficiência de remoção de matéria orgânica (EDQOf) considerando: a) condição operacional i; b) condição operacional ii .....	135
<b>Figura 30</b> -	Abundância relativa dos Gêneros de bactérias presentes nos ensaios C (sem adição de BC) e T4 (2 gbiocarvão L-1) .....	138
<b>Figura 31</b> -	Abundância relativa dos Gêneros de arqueas metanogênicas presentes nos ensaios C (sem adição de BC) e T4 (2 gbiocarvão L-1) .....	139
<b>Figura 32</b> -	Comparativo da variação de pH, alcalinidade e acidez total entre os ensaios sem adição de biocarvão e com adição (BC): ensaios II e V (COV 8 g L-1d-1); III e VI (COV 12 g L-1d-1); IV e VII (COV 16 g L-1d-1).....	142
<b>Figura 33</b> -	Concentração de metabólitos no efluente dos ensaios II, III, IV (sem adição de BC) e V, VI, VII (com adição de BC) .....	144
<b>Figura 34</b> -	Variação nas concentrações de SVT e SSV no efluente dos ensaios II, III e IV (sem BC) e V, VI e VII (com BC) .....	145
<b>Figura 35</b> -	Remoção de matéria orgânica ao longo dos experimentos no reator metanogênico. DQOf - DQO filtrada efluente; EDQOf - eficiência de remoção de DQO filtrada.....	146
<b>Figura 36</b> -	Produtividade volumétrica e rendimento de metano por carga removida nos ensaios com adição de biocarvão .....	150
<b>Figura 37</b> -	a) Análise dos grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da CS in natura (AM 1), ao final da Fase III (AM 2) e ao final da fase V (AM 3) .....	155
<b>Figura 38</b> -	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): a) biocarvão; b) estrutura do biocarvão; c) estrutura filamentosa aderida ao biocarvão; d) microrganismos aderidos ao material suporte ao final do ensaio VII.....	157

<b>Figura 39</b> -	Abundância relativa das bactérias em relação ao filo ao final do ensaio IV (sem BC) e VII (com BC).....	158
<b>Figura 40</b> -	Abundância relativa das bactérias em relação ao gênero ao final do ensaio IV (sem BC) e VII (com BC) .....	159
<b>Figura 41</b> -	Abundância relativa das arqueas em relação à: a) filo e b) gênero ao final do ensaio IV (sem BC) e VII (com BC) .....	161

## LISTA DE SIGLAS

AFLBR	<i>Anaerobic fluidized bed reactor</i> (reator anaeróbio de leito fluidizado)
AFBR	<i>Anaerobic fixed bed reactor</i> (reator anaeróbio de leito fixo)
AH	Rama de mandioca submetida à hidrólise ácida
AI	Alcalinidade intermediária
AnSBBR	<i>Anaerobic sequencing batch biofilm reactor</i> (reator anaeróbio em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada)
AnMBR	<i>Anaerobic membrane bioreactor</i> (reator anaeróbio com membranas)
ARFM	Água residuária de fecularia de mandioca
ARL	Água residuária da indústria de laticínios
ARC	Água residuária de cervejaria
AS	Água residuária sintética
ASBR	<i>Anaerobic sequencing batch reactor</i> (reator anaeróbio em bateladas sequenciais)
AOV	Ácidos orgânicos voláteis (mgHAc L <sup>-1</sup> )
AP	Alcalinidade parcial (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )
AT	Alcalinidade total (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )
AV	Acidez volátil (mgHAc L <sup>-1</sup> )
BC	Biocarvão
C	Controle
Carb	Carboidratos
CH <sub>4</sub>	Metano
CNTP	Condições normais de temperatura e pressão
C/N	Relação carbono/nitrogênio
C/P	Relação carbono/fósforo
COE <sub>A</sub>	Carga orgânica específica aplicada (gDQO gSVT <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ou gCarb gSVT <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
COE <sub>R</sub>	Carga orgânica específica removida (gDQO gSVT <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ou gCarb gSVT <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COV	Carga orgânica volumétrica (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ou gCarb L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
COV <sub>R</sub>	Carga orgânica volumétrica removida (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ou gCarb L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
CS	<i>Cassava stem</i> (rama de mandioca)

CSTR	<i>Continuous-type stirred tank bioreactor</i> (reator de fluxo contínuo com agitação)
Cu <sup>2</sup>	íon Cobre
DA	Digestão anaeróbia
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DF	Digestão anaeróbia em duas fases
DIET	<i>Direct interspecies electron transfer</i> (doação de elétrons interespecies)
DRX	Difratometria de raio-X
DQO	Demanda química de oxigênio
εDQO	Eficiência de remoção de DQO (%)
εCT	Eficiência de remoção de carboidratos (%)
Fe <sup>2+</sup>	íon Ferro
F/M	<i>Food/ microorganism ratio</i> (relação alimento/ microorganismo)
FID	Detector de ionização de chama
EMP	via Embden-Meyerhof-Parnas
FTIR	Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico (mgDQO L <sup>-1</sup> )
HAc	Ácido acético (mgDQO L <sup>-1</sup> )
HBu	Ácido butírico (mgDQO L <sup>-1</sup> )
HPr	Ácido propiônico (mgDQO L <sup>-1</sup> )
HLa	Ácido láctico (mgDQO L <sup>-1</sup> )
HPB	<i>Hydrogen producing bacteria</i> (bactérias produtoras de hidrogênio)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HY	<i>Hydrogen Yield</i> (rendimento de hidrogênio em molH <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> Carb)
K <sup>+</sup>	íon Potássio
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i> (bactérias produtoras do ácido láctico)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mn <sup>2+</sup>	íon Manganês
MRS	meio de cultura ágar Man-Rogosa-Shape
MY	<i>Methane Yield</i> (rendimento de metano em mLCH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO)
MY <sub>A</sub>	Rendimento de metano por carga aplicada (mLCH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO)
MY <sub>R</sub>	Rendimento de metano por carga removida (mLCH <sub>4</sub> g <sup>-1</sup> DQO)
ML	Material lignocelulósico

NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub> /DQO	Bicarbonato de sódio/matéria orgânica em termos de DQO
NaOH	hidróxido de sódio
NH	Rama de mandioca não hidrolisada
Ni <sup>2+</sup>	íon Níquel
NTK	Nitrogênio total kjeldahl (mg L <sup>-1</sup> )
PVB	Produção volumétrica de biogás (L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
PVH	Produção volumétrica de hidrogênio (LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
PVM	Produção Volumétrica de metano (LCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
PLT	Polissacarídeos totais (mg L <sup>-1</sup> )
PT	Proteínas totais (mg L <sup>-1</sup> )
PT/ PLT	Relação proteínas totais/ polissacarídeos totais
QH <sub>2</sub>	Vazão volumétrica de hidrogênio (LH <sub>2</sub> d <sup>-1</sup> )
QCH <sub>4</sub>	Vazão volumétrica de metano (LCH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> )
Qmm <sub>CH<sub>4</sub></sub>	Vazão molar de metano (mmolCH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> )
RA	Reator acidogênico
RM	Reator metanogênico
SS	Sólidos em suspensão (mg L <sup>-1</sup> )
SSV	Sólidos em suspensão voláteis (mg L <sup>-1</sup> )
ST	Sólidos totais (mg L <sup>-1</sup> )
SVT	Sólidos voláteis totais (mg L <sup>-1</sup> )
TC	Tempo de ciclo (h)
TDH	Tempo de detenção hidráulica (h)
TPE	Taxa de Produção de Energia (kJ L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
UAFBR	<i>Upflow fixed bed anaerobic reactor</i> (reator anaeróbio de leito fixo com fluxo ascendente)
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i> (reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente)
UF	Digestão anaeróbia em fase única
UFC	Unidades formadoras de colônias
VCA	Vinhaça de cana-de-açúcar
VH	Rama de mandioca hidrolisada no vapor
VM	Vinhaça de mandioca
Zn <sup>2+</sup>	íon Zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
3.1	INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE MANDIOCA E SEUS RESÍDUOS.....	26
3.2	DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	28
3.2.1	Sistemas Anaeróbios Operados em Duas Fases .....	29
3.2.2	Reatores Anaeróbios Operados em Bateladas Sequenciais com Biomassa Imobilizada em Materiais Lignocelulósicos.....	34
3.3	PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO .....	39
3.3.1	Vias Metabólicas da Acidogênese.....	39
3.3.2	Fatores Interferentes na Produção de Hidrogênio .....	41
3.4	Produção de Metano .....	47
3.4.1	Fatores Interferentes na Metanogênese .....	48
3.4.2	Estratégias para Otimização da Produção de Metano: A Adição de Biocarvão .	51
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
4.1	AVALIAÇÃO DA RAMA DE MANDIOCA COMO MEIO PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR (FASE I) .....	57
4.1.1	Substrato e Inóculo.....	57
4.1.2	Preparo do Material Suporte e Imobilização Celular .....	58
4.1.3	Produção de Hidrogênio.....	59
4.2	REATOR ACIDOGÊNICO (FASE II) .....	59
4.2.1	Reator e Aparato Experimental .....	59
4.2.2	Substrato .....	60
4.2.3	Inóculo e Condições Operacionais .....	61
4.3	ANSBBR METANOGÊNICO (FASE III) .....	62
4.3.1	Reator Metanogênico e Aparato Experimental .....	62

4.3.2	Inóculo e Partida do Reator .....	63
4.3.3	Condições Operacionais .....	64
4.4	PRODUÇÃO DE METANO COM ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSAGENS DE BIOCARVÃO (FASE IV).....	65
4.4.1	Produção do Biocarvão .....	65
4.4.2	Ensaio para Avaliar a Produção de Metano com Adição de Biocarvão .....	65
4.5	ANSBBR METANOGÊNICO COM ADIÇÃO DE BIOCÁRVÃO (FASE V).....	67
4.5.1	Inóculo e Partida do Reator .....	67
4.5.2	Condições Operacionais .....	67
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	68
4.6.1	Fase Líquida .....	68
4.6.2	Fase Gasosa .....	69
4.6.3	Caracterização da Rama de Mandioca e Biofilme .....	69
4.6.4	Análises Microbiológicas .....	70
4.6.5	Caracterização do Biocarvão.....	71
4.6.6	Desempenho dos Reatores.....	74
4.7	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	74
4.7.1	Quantificação da Biomassa do Sistema Acidogênico e Metanogênico .....	77
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
5.1	FASE I – AVALIAÇÃO DA RAMA DE MANDIOCA COMO MEIO PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	78
5.1.1	Hidrólise da Rama da Mandioca .....	78
5.1.2	Ensaio Preliminares: Impacto da Imobilização Celular Sobre a Produção Fermentativa de Hidrogênio .....	79
5.1.3	Imobilização Celular .....	82
5.1.4	Considerações Finais da Fase I .....	84
5.2	FASE II - REATOR ACIDOGÊNICO.....	84
5.2.1	Desempenho do Reator Acidogênico .....	84
5.2.2	Desempenho do Reator Acidogênico em Relação À Produção de Hidrogênio ..	87
5.2.3	Efeito da Adição das Ramas DE Mandioca como Material Suporte na Produção de Hidrogênio .....	92
5.2.4	Considerações Finais Fase II.....	101
5.3	FASE III - ANSBBR METANOGÊNICO .....	102

5.3.1	Monitoramento do ANSBBR Metanogênico em Relação ao PH, Alcalinidade e Conversão de Metabólitos .....	102
5.3.2	Desempenho do ANSBBR Metanogênico em Relação à Remoção de DQO ...	108
5.3.3	Desempenho do ANSBBR em Relação à Produção de Metano e Biogás.....	113
5.3.4	Desempenho do ANSBBR Metanogênico em Relação à Retenção Celular .....	118
5.3.5	Considerações Finais da Fase III.....	123
5.4	FASE IV - ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE METANO COM ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSAGENS DE BIOCARVÃO .....	123
5.4.1	Caracterização do Biocarvão .....	124
5.4.2	Efeito do Biocarvão na Produção de Metano.....	132
5.4.3	Efeito do Biocarvão no Consumo de Metabólitos e Matéria Orgânica.....	134
5.4.4	Efeito da Adição de Diferentes Dosagens de Biocarvão na Comunidade Microbiana.....	137
5.4.5	Considerações Finais da Fase IV.....	140
5.5	FASE V - ANSBBR METANOGÊNICO COM ADIÇÃO DE BIOCARVÃO .....	140
5.5.1	Desempenho do Reator Metanogênico em Relação ao PH, Alcalinidade e Conversão de Metabólitos .....	140
5.5.2	Efeito da Adição de Biocarvão na Remoção de Matéria Orgânica do Reator Metanogênico .....	146
5.5.3	Efeito da Adição de Biocarvão na Produção de Metano.....	148
5.5.4	Efeito da Adição de Biocarvão na Degradação da Rama de Mandioca e na Comunidade Microbiana .....	154
5.5.5	Considerações Finais da Fase V .....	162
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>166</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de energia tem aumentado gradativamente com o crescimento populacional e deve se expandir nos próximos anos. A matriz energética mundial é baseada em combustíveis não renováveis, e, portanto, buscar soluções que aumentem a oferta de energia a partir de fontes renováveis e sustentáveis tornou-se uma necessidade. A matriz energética brasileira é composta por 52,8% de fontes não renováveis, embora, em relação às fontes renováveis, para abastecimento doméstico, 64% são constituídos pela geração hidráulica (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2019). No entanto, a crise hídrica no Brasil, que se agravou no ano de 2021 (VENTURI et al. 2021; HUNT et al. 2021), alertou para a necessidade da diversificação das fontes de energia brasileiras, sobretudo para o uso de resíduos agroindustriais (FERREIRA et al., 2018a; SHAHBAZ et al., 2019; SOARES et al., 2020), como forma de reduzir passivos ambientais e agregar valor à cadeia produtiva.

Concomitantemente à demanda energética, ocorre o aumento da demanda de alimentos e produtos de subsistência, que aumentam, conseqüentemente, a geração de resíduos agroindustriais. O agronegócio em 2020, representou 24,31% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro encerrando o ano com quase 2 trilhões de reais, de acordo com estudo realizado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), da Universidade de São Paulo, em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) (CEPEA, 2020). No estado do Paraná, a agroindústria é um dos principais segmentos econômicos, destacando-se entre essas atividades o processamento da mandioca, o que garante ao estado o posto de maior produtor brasileiro de fécula de mandioca, com polos industriais distribuídos nas regiões norte, leste e oeste do Paraná (SECRETARIA DE AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ, 2016). No ano de 2020, o Paraná produziu aproximadamente 321000 toneladas de fécula de mandioca (DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL DO GOVERNO DO PARANÁ, 2020), cujos resíduos representariam um potencial energético de 19,67 GWh/ano (FERREIRA et al. 2018a), caso fossem aproveitados na produção de biogás.

No processamento da mandioca, são gerados resíduos como folhagens, ramas, bagaço, cascas da mandioca e água residuária oriunda dos processos de lavagem e extração da fécula (SIVAMANI et al., 2018; ISMAIL et al., 2021). Esses materiais são ricos em carboidratos, e, portanto, podem ser utilizados como substratos para geração de energia a partir da digestão anaeróbia (DA) (SÁ, et al. 2014; SÁNCHEZ et al., 2017; MEIER et al., 2020).

A digestão anaeróbia é um processo consolidado que permite a conversão de aproximadamente 70-90% da matéria orgânica em biogás (McCARTY e SMITH, 1986), promovendo sua estabilização. Embora substratos com elevada concentração de açúcares, como as águas residuárias agroindustriais, sejam facilmente hidrolisáveis e apresentem potencial para a produção de biogás, seu uso na DA pode apresentar limitações relacionadas à acidificação do reator (LUO et al., 2011; DA SILVA, et al., 2019; CREMONEZ et al., 2021). Uma estratégia para reduzir o acúmulo de ácidos e aumentar o desempenho global da digestão anaeróbia, em termos de estabilidade e eficiência de conversão, é a separação física em duas fases (DF), a acidogênese e a metanogênese (SCHIEVANO et al., 2014; PAUDEL et al., 2017). A separação de fases consiste em conduzir as etapas em reatores distintos, promovendo a conversão da matéria orgânica em ácidos orgânicos no primeiro reator para posterior conversão em acetato e metano na segunda fase (ALGAPANI et al., 2018; RAMOS e SILVA, 2020), aumentando a produtividade de metano (SCHIEVANO et al., 2014; ALGAPANI et al., 2018). Nessas condições, foram reportadas eficiências na produção de metano de 20 a 60% maiores do que em sistemas de fase única (SCHIEVANO et al. 2014; CREMONEZ et al. 2021). Essa técnica, apesar de promissora, ainda é pouco empregada em ampla escala, sendo necessário superar algumas limitações do processo (RAJENDRAN et al., 2020).

As limitações dos sistemas DF relatadas na literatura estão relacionadas à instabilidade na produção, baixos teores de hidrogênio e metano no biogás e os custos operacionais elevados. Na fase acidogênica, a redução na produtividade de hidrogênio está atrelada a instabilidades na produção e breves períodos de geração contínua ocasionados pelo crescimento excessivo da biomassa, presença de microrganismos competidores, desvios de rotas metabólicas e saturação de hidrogênio na fase líquida (ELBESHBISHY et al., 2017; LIN et al., 2018; BANU et al., 2021). As limitações no sistema metanogênico comumente estão relacionadas à maior sensibilidade dos microrganismos à composição do afluente, aos choques orgânicos e hidráulicos, além da velocidade de crescimento lento das arqueas metanogênicas (WANG et al., 2018a; SRISOWMEYA et al., 2020; SILVA et al. 2021). Além disso, a degradação de materiais complexos, como os resíduos lignocelulósicos ainda representam um desafio (KAINTHOLA et al., 2019; CREMONEZ et al., 2021). Na literatura, estudos com águas residuárias sintéticas ou suplementadas com micro e macronutrientes têm sido empregadas no desenvolvimento de novas configurações de reatores, imobilização celular em matrizes sintéticas, variações em choques de cargas orgânicas e controle de alcalinidade (XU et al., 2018; CHATTERJEE e MAZUMDER., 2019; SRISOWMEYA et al., 2020; SILVA et al., 2021). Há uma lacuna no conhecimento em relação às estratégias como uso de matrizes sustentáveis de

imobilização celular, digestão de materiais complexos e aumento do rendimento energético. Recentemente, o uso de materiais condutores como o biocarvão tem sido avaliado para melhorar o rendimento de metano na digestão anaeróbia (ZHAO et al., 2015; SUNYOTO et al., 2016; WANG et al., 2018b; WANG et al., 2020; QI et al. 2021; SUGIARTO et al., 2021). O biocarvão é um material obtido a partir da pirólise de resíduos com elevado teor de carbono, cujas propriedades podem melhorar o transporte de elétrons entre os microrganismos acetogênicos e metanogênicos (SHEN et al., 2020), possibilitando aumento do rendimento de metano (WANG et al., 2021b; JONHAVINDAR et al., 2021).

Destaca-se a necessidade de realizar estudos que viabilizem a valorização energética dos resíduos da cadeia produtiva da fécula de mandioca, tendo em vista a otimização das condições operacionais, configurações de reatores e aproveitamento dos resíduos, considerando a codigestão. Nesse sentido, entre as perspectivas a serem estudadas na DA, essa pesquisa investigou a digestão anaeróbia em duas fases como uma alternativa para agregar valor aos resíduos da indústria de processamento da mandioca, tendo em vista a recuperação de hidrogênio e metano. Utilizaram-se reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada em matriz biodegradável, considerando: i) o aumento da carga orgânica volumétrica e redução de tempo de ciclo; ii) a influência da hidrólise sobre a estrutura lignocelulósica, bem como sobre a digestibilidade dos resíduos lignocelulósicos; iii) o uso de biocarvão como condutor, promovendo a sinergia entre os microrganismos envolvidos no processo de metanogênese.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção de hidrogênio e metano em um sistema operado em duas fases composto por reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada em material lignocelulósico, utilizando como substrato a água residuária de fecularia de mandioca (ARFM).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Testar os efeitos da hidrólise ácida e da hidrólise a vapor sobre a estrutura lignocelulósica da rama de mandioca e suas implicações no processo de imobilização celular;
- b) Determinar em quais condições de carga orgânica volumétrica (11 e 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e tempo ciclo (4 e 3 h) foram verificadas a maior produção e rendimento de hidrogênio no reator acidogênico alimentado com ARFM;
- c) Determinar em quais condições de carga orgânica volumétrica (4; 8; 12; 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e tempo de ciclo (24; 12; 8 e 6 h) foram verificadas a maior produção e rendimento de metano no reator metanogênico alimentado com o efluente do reator acidogênico;
- d) Determinar a eficiência da imobilização celular em meio suporte misto, composto por rama de mandioca hidrolisada e espuma de poliuretano no reator metanogênico;
- e) Investigar qual a concentração ótima de biocarvão (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 6,0 g L<sup>-1</sup>) adicionada à biomassa metanogênica que possa proporcionar aumento da produção de metano;
- f) Determinar os efeitos da adição do biocarvão sobre a produtividade de metano considerando o aumento da carga orgânica volumétrica (8; 12; 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e redução do tempo de ciclo (12; 8 e 6 h) no reator metanogênico.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

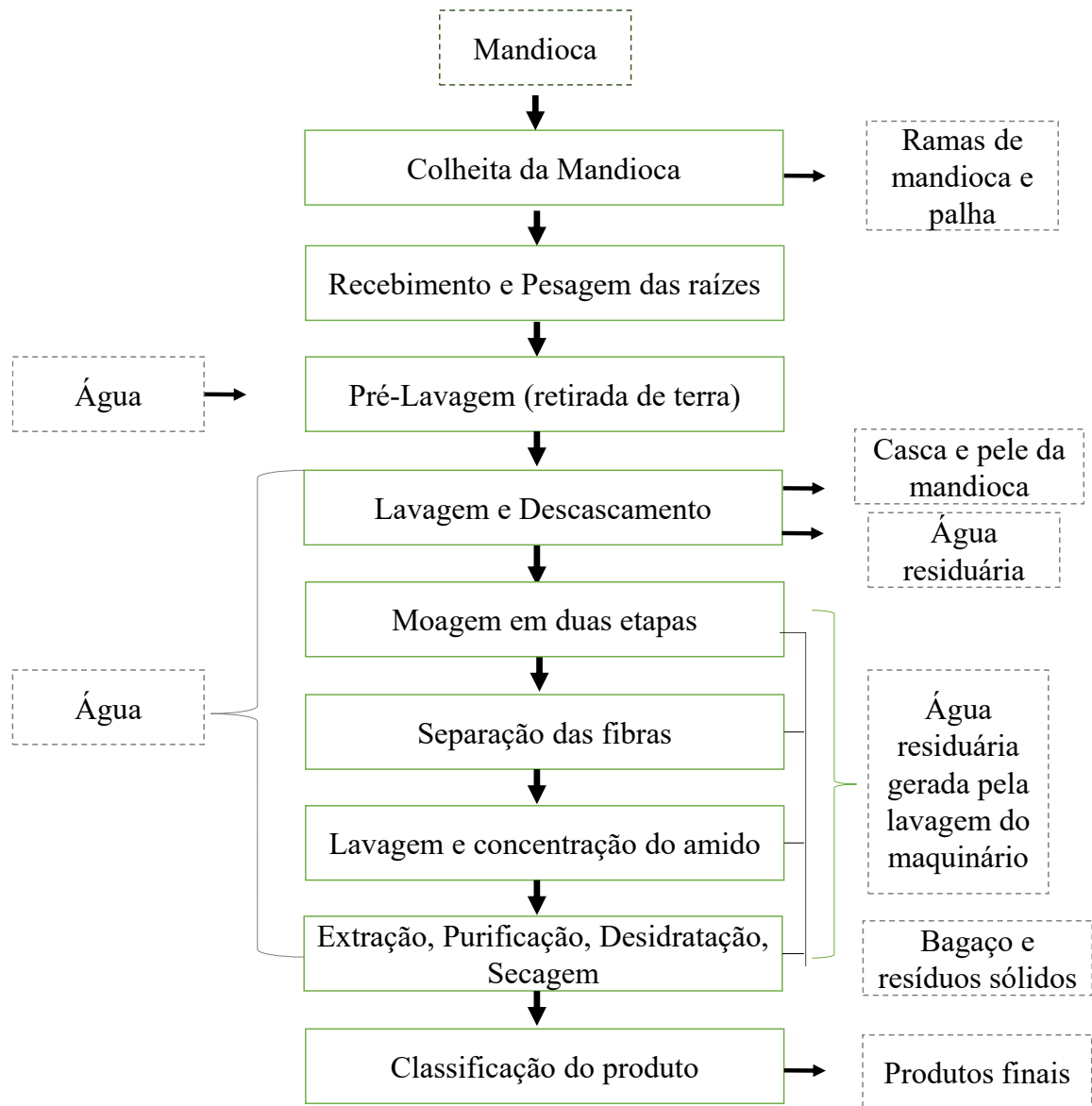
#### 3.1 INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE MANDIOCA E SEUS RESÍDUOS

A mandioca (*Manihot esculenta*) é uma das culturas em expansão em áreas tropicais, utilizada na alimentação humana, animal e como insumo industrial (JIANG et al., 2018). Em 2018, foram produzidas 277,8 milhões de toneladas de mandioca no mundo, resultado 0,5% superior à safra do ano anterior (CREMONEZ et al., 2021), enquanto no ano de 2020, o Brasil produziu aproximadamente 538800 toneladas de fécula (CEPEA, 2021).

Durante o processamento, estima-se que 40 a 90% da massa das raízes frescas de mandioca sejam convertidas em resíduos (EDAMA et al., 2014; JIANG et al., 2018). Esse material, rico em carboidratos facilmente disponíveis, pode ser aproveitado em processos biotecnológicos, como a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia (SIVAMANI et al., 2018; AMORIM et al., 2018). Outros resíduos como as folhas, caule e a casca também apresentam reservas de amido em sua composição, que variam de 10 a 60%, e podem ser utilizados na digestão anaeróbia desde que submetidos a processos que possibilitem a biodegradação da estrutura lignocelulósica (SIVAMANI et al., 2015; ZHANG et al., 2016; SIVAMANI et al., 2018; NAGARAJAN et al., 2019).

Em relação à estrutura da mandioca, 55% da planta (tubérculo e rizoma) são destinados para produção de alimentos e etanol; enquanto caule e folhas (45%) não são aproveitados no processo produtivo (SIVAMANI et al., 2018). O caule da mandioca é essencialmente lignocelulósico, ou seja, apresenta em sua composição frações de celulose e hemicelulose superiores a 70%, o que inviabiliza seu reaproveitamento para alimentação de animais, por exemplo (PATTIYA et al., 2012; SIVAMANI et al., 2018). No entanto, a realização de pré-tratamentos nesse material, como a hidrólise, pode alterar sua estrutura recalcitrante, disponibilizando os açúcares contidos na celulose, tornando-o passível para ser digerido pelos microrganismos anaeróbios (QINGHUA et al., 2011; NUWAMANYA et al., 2012).

A água residuária de fecularia de mandioca (ARFM) é oriunda dos processos de extração da fécula e lavagem das raízes em plantas industriais (Figura 1), e apresenta elevada concentração de matéria orgânica e material particulado, além da presença de nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco, manganês e ferro (SU et al., 2009). Sua composição também pode variar em função do processo produtivo, nível tecnológico da indústria e origem da raiz. Estima-se que para cada tonelada de mandioca beneficiada sejam gerados entre 5 e 7 m<sup>3</sup> de água residuária (O-THONG et al., 2011).



**Figura 1-** Fluxograma industrial do processamento da mandioca para extração de fécula.

A composição da ARFM (Tabela 1), rica em nutrientes e carboidratos, favorece seu uso como substrato para digestão anaeróbia (SREETHAWONG et al., 2010; KUCZMAN et al., 2017; MEIER et al., 2020). Entretanto, variações em sua composição podem limitar sua aplicação como substrato na etapa acidogênica, devido à presença de compostos tóxicos (GOMES et al., 2015; ANDREANI et al., 2019) e de bactérias lácticas que competem com as bactérias produtoras de hidrogênio por substrato (GOMES et al., 2015; ROSA et al., 2016), além do excesso de nutrientes, que podem impulsionar o crescimento da biomassa, desviando as rotas metabólicas (LUCAS et al., 2015; ANDREANI et al., 2015; TORRES et al., 2017; CORBARI et al., 2019).

**Tabela 1** - Caracterização físico-química da água residuária do processamento de mandioca.

Parâmetros*	Santos et al. (2017)	Palma et al. (2018)	Wadjeam et al. (2019)	Andreani et al. (2019)	Meier et al. (2020)
pH	6,7	5,2	5,2	4,9	5,4
DQO total (g L <sup>-1</sup> )	5,9	10,1	21,6	11,8	5,2
Açúcares totais (g L <sup>-1</sup> )	-	-	16,1	6,4	6,1
Sólidos totais (g L <sup>-1</sup> )	-	-	16,8	8,8	6,3
Sólidos totais voláteis (g L <sup>-1</sup> )	-	6,7	16,4	7,6	5,9
NTK (g L <sup>-1</sup> )	0,07	0,17	-	-	-

\*Valores médios; DQO - Demanda Química de Oxigênio; NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl;

### 3.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo biológico baseado na conversão de matéria orgânica em biogás, a partir da atividade sintrófica de microrganismos que não utilizam o oxigênio como acceptor final de elétrons (McCARTY e SMITH, 1986). Nas etapas de acidogênese e acetogênese, diferentes rotas metabólicas podem ocorrer, o que depende da composição do substrato em termos de carboidratos, lipídeos e proteínas (McCARTY e SMITH, 1986; AQUINO E CHERNICHARO, 2005).

Na primeira etapa da DA, compostos orgânicos complexos são hidrolisados em compostos orgânicos simples como aminoácidos, ácidos graxos e açúcares, que na acidogênese serão convertidos em ácidos orgânicos, álcoois, hidrogênio e CO<sub>2</sub> (SREETHAWONG et al. 2010; LEE et al. 2011, HASHEMI et al., 2021). Os ácidos formados na acidogênese serão oxidados durante a fase acetogênica, formando principalmente acetato, que será convertido em metano pelas arqueas metanogênicas (MCCARTY e SMITH, 1986; JHA e SHIMDT, 2017). No entanto, quando o substrato é facilmente biodegradável, pode haver acúmulo dos ácidos orgânicos e consumo de alcalinidade do meio, causando acidificação do sistema e inibição da metanogênese (GU et al. 2018, JIANG et al. 2018), sendo essa uma das principais limitações dos reatores anaeróbios operados em estágio único. Reatores de fase única comumente apresentam menor rendimento energético, uma vez que, variações no pH, temperatura e tempo de detenção hidráulica (TDH) não favorecem simultaneamente nem a acidogênese, nem a metanogênese (SCHIEVANO et al., 2014, LULLIO et al., 2014). Dessa forma, a separação da DA em duas fases configura uma alternativa para otimizar a recuperação energética do processo (RAJENDRAN et al., 2020).

### 3.2.1 Sistemas anaeróbios operados em duas fases

O sistema operado em duas fases (DF) consiste em separar a hidrólise e a acidogênese das etapas de acetogênese e metanogênese (NUALSRI et al., 2016). O efluente acidificado (primeira fase) alimenta o reator metanogênico (segunda fase), na qual ocorre a acetogênese e a geração de metano (PATCHAREE et al., 2014, AKYOL et al., 2016). Em condições operacionais adequadas, a divisão de fases proporciona condições apropriadas para cada grupo microbiano, o que possibilita aplicação de cargas mais elevadas e tempos de ciclos reduzidos, tendo em vista que a microbiota apresenta velocidades de crescimento diferentes. Enquanto os organismos acidogênicos apresentam tempo de geração de 2 a 3 horas, os metanogênicos acetoclásticos necessitam de 2 a 3 dias em temperatura mesofílica (30°C) (MOSEY, 1983; LEITE et al., 2016).

Os processos conduzidos em duas fases proporcionam controle da etapa acidogênica, reduzindo instabilidades relacionadas a sobrecargas orgânicas e acúmulo de ácidos orgânicos que poderiam provocar inibição dos microrganismos metanogênicos (LULLIO et al., 2014, AKYOL et al., 2016). Além disso, possibilita o ajuste do tempo de hidrólise no caso de materiais complexos e de difícil degradação (ZHENG et al., 2014). Outra vantagem é a possibilidade de recuperar subprodutos de valor agregado como biohidrogênio e AOV no primeiro reator e o metano no segundo reator (LULLIO et al., 2014; SCHIEVANO et al., 2014; FU et al., 2017; RAMOS e SILVA, 2020).

De acordo com Chatmerjee e Mazumber (2019), a operação de sistemas DF possibilita a aplicação de cargas orgânicas elevadas, reduzindo a ocorrência de choques de carga e aumentando a eficiência de conversão do substrato em produtos de valor agregado. As desvantagens desse sistema, estão relacionadas principalmente aos custos de operação, que são superiores aos do sistema operado em fase única (NEGRI et al., 2017; SRISOWMEYA et al., 2020), embora o aumento da recuperação energética, proporcionada pela geração de hidrogênio e metano, possa equilibrar e compensar os custos elevados (FUESS et al., 2017a; FUESS et al., 2018; CHATMERJEE e MAZUMBER, 2019; CREMONEZ et al., 2021). Schievano et al. (2014), compararam reatores anaeróbios operados em UF e DF destinados a geração de hidrogênio e metano a partir de quatro substratos. Os autores relataram aumento de até 43% no potencial energético do sistema DF em comparação ao UF, com recuperação de até 1,6 MJH<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>SV e de 19 MJCH<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup>SV.

Na última década, sistemas operados em duas fases têm sido empregados no tratamento e na recuperação energética de resíduos agroindustriais. Nas Tabelas 2 e 3 foram compilados estudos que abordaram sistemas conduzidos em uma e duas fases, respectivamente. Observa-se que os estudos conduzidos em sistemas operados em duas fases descritos na Tabela 3 apresentaram elevados rendimentos de hidrogênio e metano, além de elevadas eficiências na remoção de matéria orgânica. Nasr et al. (2012) avaliaram a produção de metano utilizando vinhaça de milho como substrato em um reator anaeróbio em bateladas sequenciais (ASBR) contemplando estratégias de operação de uma e de duas fases. Os autores obtiveram aumento de 21% no rendimento de metano para o sistema de duas fases, alcançando  $0,33 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$ . De forma semelhante, Yazar et al. (2016) obtiveram rendimento 75% superior para o ASBR em DF utilizando água residuária da indústria de laticínios (ARIL) como substrato. Fontana et al. (2018) compararam a operação de reatores de fluxo contínuo com agitação de fase única com de duas fases utilizando ARIL como substrato e verificaram rendimento teórico de até 95% de metano no DF, enquanto no de fase única o rendimento teórico foi de apenas 33%.

A fim de analisar a resiliência dos reatores anaeróbios, os estudos operados em duas fases contemplam variações nas condições operacionais como temperatura (entre mesofílica e termofílica), pH, agitação e aumento na carga orgânica. Na fase acidogênica são reportadas limitações como crescimento excessivo da biomassa e presença de microrganismos competidores, seja em sistemas de uma ou duas fases, refletindo taxas de produção de hidrogênio variáveis na maioria dos estudos (Tabelas 2 e 3). No entanto, a separação de fases permite aplicação de cargas orgânicas maiores no reator acidogênico (CHENG et al. 2015; LI et al. 2020), alcançando maiores rendimentos energéticos de metano.

**Tabela 2** - Desempenho de reatores anaeróbios de fase única destinados à produção de hidrogênio ou metano.

Substrato	Reator	Objetivo	Condições experimentais	Principais Resultados			Referência
				EDQO (%)	H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	
ARFM	CSTR	Produção de H <sub>2</sub>	Temperatura: 60°C; TDH 5 dias	-	264 mLH <sub>2</sub> gCarb <sup>-1</sup>	-	O-Thong et al. (2011)
VM	ASBR	Produção de H <sub>2</sub>	Temperatura: 37, 60 e 70 °C; pH 4-10	-	53,8 mLH <sub>2</sub> gVS <sup>-1</sup>	-	Luo et al. (2010)
VCM	ASBR	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 37°C; F/M: 4,6 -8,0 gDQO gSSV <sup>-1</sup>	-	-	0,26 LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Nasr et al. (2012)
VCA	UASB	Produção de H <sub>2</sub>	Temperatura: 55°C; COV 88,2 kgDQO m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup>	33	2,4 molH <sub>2</sub> molCarb <sup>-1</sup>	-	Ferraz Jr et al. (2014)
ARC	UASB	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 37°C; pH 6,5 -7,2 TDH entre 8-12 h	78	-	Teor de 66% CH <sub>4</sub> no biogás	Enitan et al. (2014)
ARFM	UASB	Produção de CH <sub>4</sub>	TDH 1-5 dias; COV 3,76 -18,8 kgDQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	91	-	84,56 mLCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Jijai et al. (2015)
ARIL	ASBR	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 25-35 °C; pH 7-7,2 TDH de 1-15 dias [DQO <sub>a</sub> ]: 5, 10 e 15 g L <sup>-1</sup>	75	-	390 mLCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> gDQO <sup>-1</sup>	Yazar et al. (2016)
VCA	AnSBBR	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 55 °C; Batelada alimentada	-	-	16,76 mmolCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Volpini et al. (2018)
ARIL	CSTR	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 55 °C TDH: 15 dias	-	-	Teor de 33% de CH <sub>4</sub> no biogás	Fontana et al. (2018)

ARIL – Água residuária da indústria de laticínios; VCA- Vinhaça de cana-de-açúcar; VCM – Vinhaça de milho; VM – Vinhaça de mandioca; ARC – Água residuária de cervejaria; ASBR - *anaerobic sequencing batch reactor* (reator anaeróbio em bateladas sequenciais); UASB - *upflow anaerobic sludge blanket* (reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente); AFBR – *anaerobic fixed bed reactor* (reator anaeróbio de leito fixo); F/M: *food/ microorganism ratio* (relação alimento/ microrganismo).

**Tabela 3** - Desempenho de reatores anaeróbios em duas fases destinados a produção de hidrogênio ou metano (continua)

Substrato	Reator	Objetivo	Condições experimentais	Principais Resultados			Referência
				EDQO (%)	H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	
ARIL	CSTR +ABR	Produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub>	Temperatura: 35°C; TDH de 24 h (acidogênese); e 4,4, 10 e 20 d (metanogênese);	Remoção global > 94	0,041 LH <sub>2</sub> gDQO <sup>-1</sup>	0,31 LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Antonopoulou et al. (2008)
VCM	ASBR	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 37 °C; F/M: 4,6 -8,0 gDQO gSSV <sup>-1</sup>	-	-	0,33 LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Nasr et al. (2012)
ARFM	UASB	Produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub>	Temperatura: 55°C; pH 5,5	35% acidogênico 72% metanogênico	54,22 mLH <sub>2</sub> gDQO <sup>-1</sup>	164,87 mLCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Patcharee et al. (2014)
ARFM	ASBR	Produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> com variação na [DQO]	Temperatura: 55°C; [DQO <sub>a</sub> ]: 5, 10 e 15 g L <sup>-1</sup>	-	81,5 LH <sub>2</sub> kgDQO <sup>-1</sup>	310,5 LCH <sub>4</sub> kgDQO <sup>-1</sup>	Khongkliang et al. (2015)
ARIL	ASBR	Produção de CH <sub>4</sub>	Temperatura: 25-35 °C; pH 7-7,2 TDH de 1-15 dias [DQO <sub>a</sub> ]: 5, 10 e 15 g L <sup>-1</sup>	75	-	1560 mLCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> gDQO <sup>-1</sup>	Yazar et al. (2016)
VCA	AFBR	Recuperação energética da vinhaça	Temperatura: 55°C; COV acima de 30kgDQO m <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup>	Remoção global > 80	3,4 mol H <sub>2</sub> molCarb	301 mLCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Fuess et al. (2017b)
VCA	ASBR	Recuperação energética da vinhaça	Temperatura: 55°C; Agitação 120 rpm	-	14,8 mLH <sub>2</sub> gVS <sup>-1</sup>	274 mLCH <sub>4</sub> gVS <sup>-1</sup>	Fu et al. (2017)
ARC	ASBR	Recuperação energética dos grãos usados em cervejaria	Temperatura: 38°C [SV]: 211-263g kgDQO <sup>-1</sup>	-	Rendimento de biogás 392 – 491 mL gSV <sup>-1</sup>		Panjiko et al. (2017)

**Tabela 3** – Desempenho de reatores anaeróbios em duas fases destinados a produção de hidrogênio ou metano (continuação).

Substrato	Reator	Objetivo	Condições experimentais	Principais Resultados			Referência
				EDQO (%)	H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	
VCA	UASB	Recuperação energética da vinhaça	Temperatura: 55°C; pH 7,0	24 % acidogênico 78 % metanogênico	-	0,274 m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> kgDQO <sup>-1</sup>	Santana Jr et al. (2019)
ARFM	UASB	Produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> a partir da adição de bagaço de mandioca	Temperatura: 55°C COV 10,29 kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>	Remoção global > 65	Teor de 43% de H <sub>2</sub> no biogás	Teor de 70% de CH <sub>4</sub> no biogás	Chavadej et al. (2019)
ARC + SC	ASBR +UASB	Produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub>	Temperatura: 55°C; TDH: 16h – 24h	Remoção global > 75	0,36 mLH <sub>2</sub> gDQO <sup>-1</sup>	270,3 mLCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup>	Xu et al. (2019)
VCA	AnMBR	Avaliação da relação DQO/sulfato no tratamento da vinhaça	Razão DQO / sulfato de 9,04-93,85; TDH de 0,48 d (acidogênese); TDH de 2,58 d e pH acima de 7,0 (metanogênese);	Remoção global > 97	-	-	Silva et al. (2020)
ARIL	CSTR	Codigestão da ARIL com resíduos agroindustriais	Temperatura de 37 °C; pH de 5,7 e TDH de 3-6 d (fase acidogênica); pH de 7,5-8,3 e TDH de 37 d (fase metanogênica)	Remoção global > 72	0,76 molH <sub>2</sub> molCarb <sup>-1</sup>	318 mLCH <sub>4</sub> gVS <sup>-1</sup>	Sakarika et al. (2020)

SC – Suinocultura; CSTR - *continuous-type stirred tank bioreactor* (reator contínuo com agitação); AnMBR – *anaerobic membrane bioreactor* (reator anaeróbio com membranas); [DQO]: concentração de matéria orgânica; [SV]: concentração de sólidos voláteis.

Em função do elevado teor de açúcares disponíveis, as principais águas residuárias agroindustriais estudadas na produção de biohidrogênio e metano são oriundas do processamento da cana-de-açúcar, dos laticínios, da produção de cerveja e da extração de fécula de mandioca. No entanto, materiais complexos, como os resíduos sólidos agroindustriais, que apresentam composição lignocelulósica, continuam sendo um desafio. Poucos estudos abordam a codigestão desse tipo de resíduo e de águas residuárias agroindustriais. Do levantamento realizado, apenas Chavadej et al. (2019) e Sakarika et al. (2020) abordaram a mistura de resíduos complexos e alcançaram resultados de 70% de metano no biogás e rendimento de 318 mLCH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre as estratégias e perspectivas futuras a serem estudadas, são citados o uso de cepas isoladas de microrganismos capazes de aumentar a produção de biogás; alterações tecnológicas na configuração dos reatores anaeróbios, como o uso de materiais degradáveis como material suporte; técnicas para aumentar a digestibilidade de materiais complexos (como os diferentes tipos de hidrólise) e a mistura de resíduos, considerando a codigestão (ARREOLA-VARGAS et al., 2016; PANJIKO et al., 2017; XU et al., 2019; CHAVADEJ et al., 2019; SAKARIKA et al., 2019; CREMONEZ et al., 2021).

### 3.2.2 Reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada em materiais lignocelulósicos

Reatores anaeróbios destacam-se no tratamento de águas residuárias pela economia de energia, facilidade de implementação e baixa geração de lodo (ZAIAT et al., 2001). Os reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais (ASBR) têm sido aplicados com sucesso no tratamento de águas residuárias industriais geradas de forma intermitente (OLIVEIRA et al., 2010; REJAB et al., 2017), pois são eficientes na remoção de matéria orgânica e dos sólidos, além de apresentar controle de operação simples (ZAIAT et al., 2001). Ratusznei et al (2000) propuseram a configuração dos reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) para sanar limitações relacionadas à granulação do lodo e arraste de biomassa. Como consequência, foi possível operar com tempos de ciclo reduzidos e eliminar a etapa de sedimentação. Essa configuração foi amplamente estudada no tratamento de águas residuárias de características sanitárias e industriais, apresentando resultados promissores (CANTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; CUBAS et al., 2011; BEZERRA et al., 2011; LIMA et al., 2015; LIMA et al., 2016). Recentemente, diversos estudos têm abordado a utilização do AnSBBR visando a produção de biohidrogênio e metano a partir da ARFM (TONELLO et al., 2018; ANDREANI et al., 2019; MARI et al., 2020).

O AnSBBR oferece vantagens como melhores condições de controle operacional (carga-reação-descarga), flexibilidade no modo de alimentação (batelada e batelada alimentada) e resistência às variações na composição e concentração de águas residuárias (BEZERRA et al., 2011; LOVATO et al., 2015). Além desses fatores, um dos principais diferenciais do AnSBBR em comparação aos demais reatores anaeróbios é a capacidade de resistência a sobrecarga orgânica relacionada à imobilização celular (LOVATO et al., 2015; VOLPINI et al., 2018). De acordo com Aquino e Chernicharo (2005), a agregação da biomassa em biofilmes e a granulação, além de propiciar a complementação de nichos funcionais e diversidade no reator, resulta em maior redundância metabólica e, conseqüentemente, em maior estabilidade. As vantagens do crescimento microbiano aderido, em relação ao crescimento em suspensão, incluem maior tolerância a alterações do ambiente, estabilidade do processo e maior atividade biológica, uma vez que ocorre o aumento da densidade celular no reator (PLANGKLANG et al., 2012).

Nos reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais alimentados com águas residuárias agroindustriais, normalmente a imobilização celular é realizada em materiais sintéticos que favorecem a elevada porosidade do leito, como espuma de poliuretano (LOVATO et al., 2012; ALBANEZ et al., 2016a; VOLPINI et al., 2018; LOVATO et al., 2019) e polietileno de baixa densidade (MANSSOURI et al., 2013; INOUE et al., 2014; LOVATO et al., 2015; ALBANEZ et al., 2016b; TONELLO et al., 2018; ANDREANI et al., 2019). Manssouri et al. (2013) avaliaram o desempenho de um AnSBBR na produção de biohidrogênio, utilizando aparas de polietileno de baixa densidade como material suporte e água residuária sintética a base de sacarose como substrato. Os autores testaram diferentes COVs ( $9,0 - 27,0 \text{ kgDQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ ), concentração afluenta ( $3600 - 5400 \text{ mgDQO L}^{-1}$ ) e tempos de ciclo (4, 3 e 2 h) e verificaram que a maior concentração de  $\text{H}_2$  no biogás (25%) ocorreu para COV entre  $12 - 13,5 \text{ kgDQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , enquanto os maiores rendimentos ( $2,83$  e  $3,04 \text{ molH}_2 \text{ kgDQO}^{-1}$ ) ocorreram para COV de  $13,5 \text{ kgDQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ .

Lovato et al. (2019) avaliaram a codigestão da vinhaça com soro de leite em um AnSBBR com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano. Os autores compararam a estratégia de alimentação em batelada (tempo de enchimento: 10 min e aumento na adição da vinhaça de 0 – 100% na codigestão com soro de leite) e batelada alimentada (tempo de alimentação = 4 h com percentual de 50% vinhaça e 50% soro de leite). O aumento da porcentagem de vinhaça de 0 a 100% no afluenta resultou em uma diminuição na produtividade de  $76,3$  para  $51,1 \text{ molCH}_4 \text{ m}^{-3}\text{d}^{-1}$  e do rendimento de  $12,7$  para  $9,1 \text{ molCH}_4 \text{ kgDQO}^{-1}$ . No

entanto, a adoção da batelada alimentada resultou em uma operação mais estável na produção de metano com produtividade e rendimento de  $73,0 \text{ molCH}_4 \text{ m}^{-3}\text{d}^{-1}$  e  $11,5 \text{ molCH}_4 \text{ kgDQO}^{-1}$ , respectivamente.

### 3.2.2.1 *Uso de resíduos lignocelulósicos como material suporte*

A imobilização celular em materiais lignocelulósicos (ML) tem sido pouco reportada pela literatura (KUMAR et al., 2016) como forma inovadora de aliar o reaproveitamento de resíduos sólidos agroindustriais à produção energética. A biomassa lignocelulósica possui estrutura complexa, constituída por celulose, hemicelulose e lignina (TRAVAINI et al., 2016). A celulose é um polímero natural de alto peso molecular composto por unidades de glicose. Já a hemicelulose possui estrutura heterogênea e amorfa, composta por ramificações de pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (CHEN, 2014; BAJPAI, 2017), sendo o segundo polímero mais abundante na biomassa lignocelulósica, e responsável por conectar a lignina e a celulose (CHEN, 2014; SOARES et al., 2020). A lignina apresenta uma estrutura molecular complexa, constituída por polímeros fenólicos aromáticos, apresentando resistência rígida e impermeável, o que dificulta sua degradação pelos microrganismos (KUMAR et al., 2015; BAJPAI, 2017).

Para alterar essa estrutura rígida e aumentar sua porosidade, técnicas como a hidrólise podem ser aplicadas. A hidrólise auxilia na alteração da estrutura recalcitrante heteropolimérica, reduzindo sua cristalinidade e tornando os carboidratos presentes nas células vegetais disponíveis para os microrganismos durante a digestão anaeróbia (KUMAR et al., 2015; ZIEMIŃSKI e KOWALSKA-WENTEL, 2017).

De acordo com Zheng et al. (2014), a hidrólise pode ser física (redução de tamanho; corte do material; aquecimento e vapor); química (alcalina; ácida; enzimática; líquido iônico) ou microbiológica (adição de microrganismos como fungos, por exemplo), sendo também possível a combinação entre esses tratamentos para aumentar a eficiência de conversão da celulose em açúcares fermentáveis. Dentre os métodos citados, a hidrólise ácida e a hidrólise a vapor são métodos eficientes, simples e de baixo custo (KUMAR et al., 2015; ZIEMIŃSKI e KOWALSKA-WENTEL, 2017; GOKFILIZ e KARAPINAR, 2017; HU e ZHU, 2017). A hidrólise ácida e alcalina são métodos amplamente abordados na literatura, pois são eficientes e favorecem a dispersão de açúcares no meio, embora possam resultar em subprodutos como o furfural, o álcool vanílico e o hidroximetilfurfural (5-HMF), compostos que podem inibir os microrganismos, reduzindo a produção de gás durante a digestão anaeróbia (CAO et al., 2009; KARKI et al., 2011; ZHOU et al., 2012; RAMPRAKASH e MUTHUKUMAR, 2015). Dessa

forma, algumas soluções tem sido propostas para minimizar a geração e o efeito de compostos inibidores. Zheng et al. (2014) reportaram que a utilização de ácidos orgânicos, em substituição aos inorgânicos, pode gerar menor concentração de compostos inibidores, além de reduzir os custos dessa etapa. O uso de culturas mistas também diminui a inibição proporcionada pelo furfural e o 5-HMF, conforme verificado por Muñoz-Paez et al. (2019), devido à complexidade microbiana presente nas culturas mistas.

Nas indústrias de processamento de mandioca, estima-se que para 100 kg de amido produzido, são gerados 11,1 kg de resíduos sólidos (CHAVADEJ et al., 2019), tais como ramas, bagaço e folhas, que apresentam composição lignocelulósica de difícil biodegradação. Woiciechowski et al. (2002) submeteram o bagaço da mandioca à hidrólise ácida (HCl 1,5 %) e enzimática (alfa-amilase e amiloglicosidase) para avaliar a eficiência dos métodos na conversão do material lignocelulósico a açúcares. Embora ambos os tratamentos tenham ocasionado aumento dos açúcares redutores em 97% e 94,5%, respectivamente, a hidrólise ácida foi mais vantajosa, uma vez que foi realizada em apenas 10 minutos, enquanto a enzimática ocorreu durante 25 horas e 20 minutos.

Além da liberação de açúcares, a hidrólise também possibilita o aumento na área superficial do material lignocelulósico, favorecendo a adesão de microrganismos e possibilitando seu uso como suporte para a imobilização celular (ZHENG et al., 2014). Liu et al. (2020) avaliaram a coprodução de hidrogênio e butanol utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como meio para imobilização celular durante a fermentação. O bagaço foi fracionado (10 mm), e posteriormente introduzido em um digestor anaeróbio alimentado com água residuária sintética a base de glicose (60 g L<sup>-1</sup>). Nessas condições, os autores obtiveram rendimento de 1,89 molH<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>glicose, produção volumétrica de 537 mLH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e concentração máxima de solvente (acetona, butanol e etanol) de 18,2 g L<sup>-1</sup>. No entanto, é importante mencionar que o experimento conduzido por Liu et al. (2020) limitou-se a 4 bateladas de 3 dias cada. Segundo os autores, a repetição das bateladas por períodos mais longos poderia promover a decomposição do bagaço. O que justifica a necessidade de investigar a imobilização celular em materiais lignocelulósicos por períodos de tempo mais longos.

Não foram encontrados na literatura estudos que abordassem a imobilização celular em resíduos lignocelulósicos e sua codigestão de forma concomitante durante a DA. Dessa forma, é importante destacar que o uso de ML na imobilização celular pode funcionar como meio para adesão de microrganismos, assim como cosubstrato, uma vez que, após a sua hidrólise, os açúcares e nutrientes se tornam acessíveis aos microrganismos. A codigestão de águas

residuárias com resíduos lignocelulósicos tem sido apontada como estratégia para aumentar a concentração de micro e macronutrientes e equilibrar a relação carbono/nitrogênio (C/N), proporcionando elevados rendimentos em termos de biohidrogênio e metano (LIN et al., 2015; Y. LIN et al., 2014; ZHU et al., 2014), pois esses materiais são ricos em carboidratos e apresentam baixo teor de proteínas (CANILHA et al., 2012). De acordo com Negi et al. (2018), a produção de metano pode ser incrementada quando o material lignocelulósico é codigerido com materiais ricos em nitrogênio, como lodo, resíduos alimentares e águas residuárias, desde que observadas as proporções de 2:1: e 3:1, respectivamente. Chavadej et al. (2019) avaliaram a produção de hidrogênio e metano em um sistema de duas fases composto por reatores UASB termofílicos (55°C), utilizando como substratos a ARFM (COV de 10,27 kgDQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>) e o bagaço de mandioca (1200 mg L<sup>-1</sup>). Nessas condições, os autores obtiveram concentrações de 42% de H<sub>2</sub> e 70,5% de CH<sub>4</sub> no biogás e produtividade de 0,63 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 0,82 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, enquanto sem a adição do bagaço, o reator apresentou teores de 35% de H<sub>2</sub> e 60% de CH<sub>4</sub> no biogás, com produtividade de 0,33 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 0,53 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

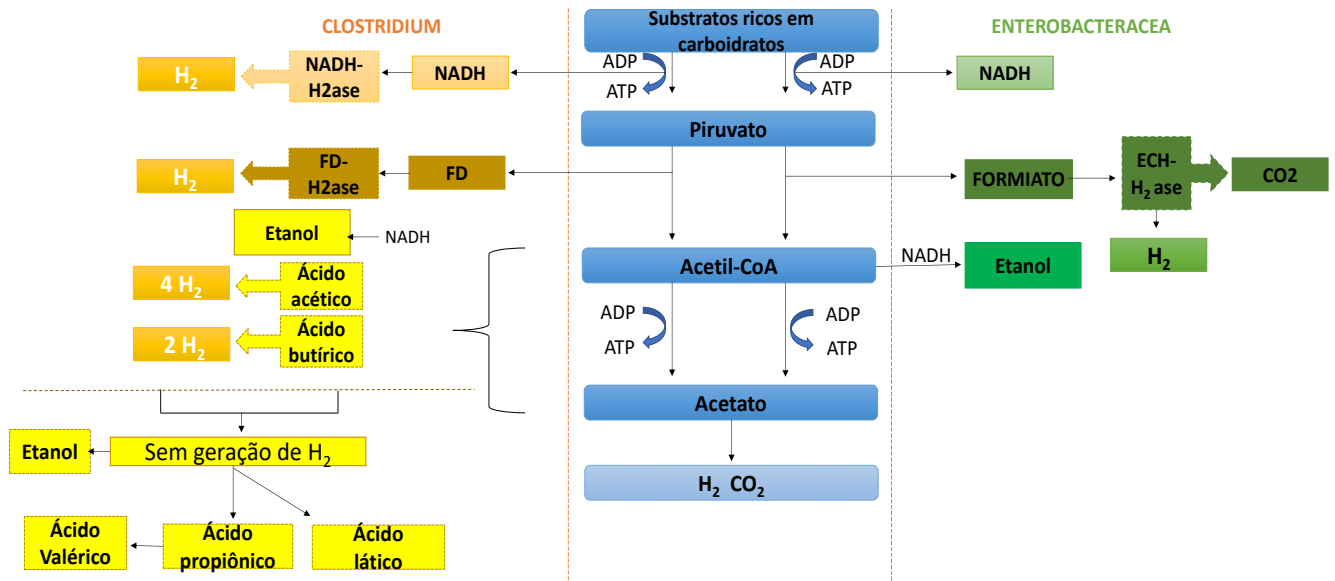
Mussolini et al. (2013) avaliaram a codigestão anaeróbia de lodo de suinocultura, resíduos da indústria de papel e celulose e palha de arroz. A proporção de palha de arroz adicionada à mistura de lodo e resíduos de papel e celulose foi de 5:5 e 5:10. Os autores verificaram maior estabilidade na produção de biogás e rendimento de 330 LCH<sub>4</sub> kgSV<sup>-1</sup> quando a proporção da mistura foi de 5:10. Xiong et al. (2020) estudaram a codigestão anaeróbia da água residuária do processamento de soja utilizando a palha de soja como cosubstrato. Os ensaios foram realizados com a palha *in natura* e submetida aos tratamentos térmico (80 °C por 25 min) e alcalino (NaOH 2% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4,5%). O maior rendimento de 206 mlCH<sub>4</sub> gSV<sup>-1</sup> foi obtido nos ensaios em que a palha de soja foi submetida ao tratamento alcalino, devido aos efeitos sinérgicos proporcionados pela liberação de açúcares e nutrientes do material hidrolisado. Lopez-Hidalgo et al. (2018) estudaram a codigestão da palha de trigo com o soro de queijo para equilibrar a relação C/N (próxima de 140), o que possibilitou produtividade estável de hidrogênio de até 89,5 mLH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Pachapur et al. (2015) estudaram a codigestão de bagaço de maçã com glicerol bruto, utilizando culturas de *Enterobacter aerogenes* e *Clostridium butyricum*, e verificaram aumento de 10% na produtividade de H<sub>2</sub>, alcançando 26 mmolH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Li et al. (2020) aumentaram em 28% a produção de H<sub>2</sub> a partir do melaço de cana-de-açúcar usando folhas de *Ginkgo biloba* como cosubstrato. Embora os estudos enfoquem efeitos positivos da adição de cosubstratos, em alguns casos, o excesso de substrato pode provocar inibições à comunidade microbiana, sobretudo em sistemas nos quais a digestão anaeróbia é conduzida em fase única (YANG e WANG, 2019).

### 3.3 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

Para que a produção de hidrogênio ocorra, a digestão anaeróbia deve ser interrompida durante a fase acidogênica. Para isso, são adotadas diferentes estratégias, como o controle de pH (faixa 6,0), o tratamento do inóculo, a aplicação de COVs elevadas e de tempos de detenção hidráulica reduzidos, o que permite a seleção dos microrganismos produtores de H<sub>2</sub> em detrimento dos consumidores (SINHA e PANDEY, 2011; SHOW et al., 2012; HU et al., 2013; AMORIM et al., 2018). A produção de H<sub>2</sub> durante a fermentação está relacionada à capacidade dos microrganismos reduzirem os prótons (H<sup>+</sup>) a hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>) por meio das enzimas hidrogenases (LEE et al., 2011). Essas enzimas estão agrupadas em duas famílias principais, de acordo com o metal existente em seu centro de ativação. As FeFe-hidrogenase são características de microrganismos anaeróbios estritos e contêm somente ferro (SÁ et al., 2014), enquanto as [Ni-Fe]-hidrogenases e as [Ni-Fe-Se]-hidrogenases são relacionadas a presença de níquel e selênio (ROY e DAS, 2016).

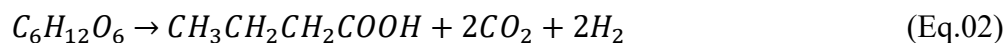
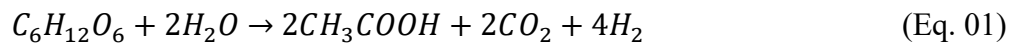
#### 3.3.1 Vias metabólicas da acidogênese

Alguns microrganismos anaeróbios estritos, como o *Clostridium* sp., são capazes de produzir H<sub>2</sub>. Eles fermentam a glicose gerando o piruvato, que por sua vez é convertido em acetil-CoA por meio da enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR), produzindo ferredoxina reduzida. A redução da ferredoxina transfere elétrons à [FeFe]-hidrogenase, garantindo a produção de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose consumida através da via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (HALLENBECK, 2005). Adicionalmente, 2 mols de hidrogênio podem ser produzidos a partir do NADH gerado durante a glicólise, apresentando rendimento máximo teórico de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose (LIU et al., 2020). As bactérias anaeróbias facultativas da família *Enterobacteriaceae* não produzem coenzimas específicas como a PFOR, em contrapartida, metabolizam piruvato a acetil-CoA e ácido fórmico, sendo este último degradado a H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (HALLENBECK, 2005; HWANG et al., 2004; HUNG et al., 2011). A Figura 2 representa as vias metabólicas dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter*, que produzem hidrogênio a partir da fermentação de açúcares.

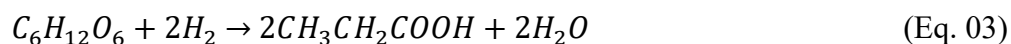


**Figura 2** - Possíveis rotas metabólicas dos microrganismos dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter* para a produção de biohidrogênio. NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo; ADP: Adenosina Difosfato; ATP: Adenosina trifosfato; NADH-H<sub>2</sub>ase: NADH-hidrogenase; FD: Ferredoxina; FD-H<sub>2</sub>ase: Ferredoxina hidrogenase; ECH (NiFe)-H<sub>2</sub>ase: hidrogenase a partir de enterobactérias. Elaborado a partir de Hallenbeck e Ghosh (2009).

A quantidade de hidrogênio produzida está relacionada à rota metabólica utilizada pelos microrganismos na conversão da glicose em hidrogênio. Considerando os anaeróbios estritos como o *Clostridium* sp., quando o acetato é o produto intermediário da fermentação, é possível produzir 4 mols de hidrogênio a partir de 1 mol de glicose (rendimento teórico), conforme apresentado na equação (Eq. 01). Se o ácido butírico for o principal produto intermediário (Eq. 02), o rendimento teórico é de 2 mols de H<sub>2</sub> por mol de glicose (HAWKES et al., 2007; JIANG et al., 2013). Entretanto, na prática, rendimentos elevados de H<sub>2</sub> estão associados à produção conjunta de ácido acético e ácido butírico, mas ainda apresentam rendimentos inferiores a 3 mols de H<sub>2</sub> por mol de glicose (HAWKES et al., 2007; JIANG et al., 2013).



A formação de alguns metabólitos pode ocorrer com consumo de hidrogênio, como na geração de ácido propiônico (HPr – Eq. 03) ou sem resultar na geração de hidrogênio como subproduto final, como nos casos do ácido láctico (HLA; Eq. 04) e do etanol (Eq. 05) (SREETHAWONG et al., 2010).





A relação acetato/butirato pode ser correlacionada ao rendimento de H<sub>2</sub>, assim como a quantificação de álcoois e dos níveis da enzima hidrogenase, pois é pouco provável que o processo aconteça seguindo exclusivamente uma única via metabólica (HWANG et al., 2004; FERREIRA et al., 2018b), enquanto as duas vias (do acetato e do butirato) levam à produção de biohidrogênio, conforme verificado na Figura 02. Elevadas relações acetato/butirato são obtidas na fermentação de águas residuárias sintéticas, no entanto, em águas residuárias reais, a proporção de ácido butírico costuma ser maior que a de acetato (ŁUKAJTIS et al., 2018). Embora seja importante ressaltar que pode haver produção de acetato desvinculada da produção de hidrogênio, como no caso da homoacetogênese, na qual ocorre consumo de H<sub>2</sub> (ANZOLA-ROJAS e ZAIAT, 2016).

Os estudos de Hafez et al. (2010); Ferraz et al. (2014); Ferreira et al. (2018b) associam altas taxas de produção de hidrogênio a substratos ricos em açúcares a baixas razões butirato/acetato (0,3 e 0,9). De acordo com Li et al. (2007), para fermentação de substratos ricos em carboidratos facilmente fermentáveis, os ácidos HAc e HBU podem ser os principais produtos da fermentação em sistemas operados com pH entre 4,5 a 6,0, enquanto a produção de ácido propiônico pode ser favorecida em valores de pH entre 5,5 e 6,0.

A rota metabólica do acetato-etanol pode ser favorecida dependendo das características do substrato e condições operacionais. Em condições de sobrecarga do substrato, com o aumento da pressão parcial de H<sub>2</sub> a via do butirato pode levar a produção do ácido propiônico, reduzindo a produção de hidrogênio, enquanto a via etanol-acetato favorece a produção de ácido acético e H<sub>2</sub> (FERREIRA et al., 2018b). A temperatura, aliada às características da cultura microbiana e do substrato, exerce uma função importante na determinação da via metabólica, uma vez que temperaturas mesofílicas entre 30 - 40 °C beneficiam a produção de ácido acético e etanol (LEE et al., 2006; KARADAG et al., 2009 e FERREIRA et al., 2018b). No entanto, quanto mais etanol é produzido (solventogênese), menos acetato é gerado, o que resulta em menores rendimentos de hidrogênio (WU et al. 2007; BRAGA et al. 2015).

### 3.3.2 Fatores interferentes na produção de hidrogênio

Em reatores acidogênicos, o uso de inóculos obtidos a partir de culturas mistas assegura que diferentes microrganismos trabalhem em conjunto no processo de biodegradação. No entanto, culturas mistas podem conter microrganismos que competem por substrato ou que podem inibir as bactérias produtoras de hidrogênio, reduzindo seu desempenho durante a acidogênese. Há várias técnicas de enriquecimento do inóculo com produtores de hidrogênio,

como uso de agentes ácidos e básicos, compostos químicos, ultrassom e aquecimento (WANG e WAN, 2008; LUO et al., 2010). O tratamento térmico é mais empregado devido à sua simplicidade e baixo custo, consistindo em aquecer o inóculo a temperaturas entre 70 e 100 °C (KOBAYASHI et al. 2012). O tratamento prévio do inóculo é uma estratégia para selecionar os microrganismos de interesse, e se baseia na diferença fisiológica, sobretudo de capacidade de esporulação entre as bactérias (LUO et al. 2010), uma vez que as bactérias produtoras de hidrogênio, principalmente do gênero *Clostridium* são capazes de esporular (WONGTHANATE et al. 2014). A literatura reporta o aquecimento a 95 °C por 15 minutos como sendo eficiente para que o tratamento seja efetivo, inclusive em estudos que utilizaram a ARFM como substrato para a produção de hidrogênio (SREETHAWONG et al., 2010) TONELLO et al., 2018; ANDREANI et al., 2019).

Outro fator que impacta a produção de H<sub>2</sub> é o pH, cujas variações ao longo da fermentação podem alterar o espectro de subprodutos, a estrutura da comunidade microbiana e as funções intracelulares (GUO et al., 2014; REN et al., 2011). Quando o pH do meio é reduzido (< 4,0), atividade metabólica dos microrganismos do gênero *Clostridium* é alterada, cessando a produção de hidrogênio e iniciando a produção de solventes (solventogênese) (LIN et al., 2012; ROY e DAS, 2016). Além disso, em pH inferior a 4,0, os ácidos orgânicos permanecem não dissociados, sendo capazes de penetrar na membrana celular microbiana, cujo pH intracelular é neutro, e interferir em suas atividades metabólicas (VAN GINKEL e LOGAN, 2005; ARIMI et al., 2015; ELBESHBISHY et al., 2017). O acúmulo de ânions dentro da célula aumenta a osmolaridade do citoplasma e a pressão de turgor da célula, enquanto o acúmulo de prótons diminui o pH intracelular, ativando enzimas essenciais para a produção de solventes, dessa forma, a célula gasta energia tentando bombear os prótons em uma tentativa de manter o pH interno em faixa adequada, não conseguindo realizar outras atividades, como crescimento e produção de hidrogênio (KHANAL et al., 2004; ELBESHBISHY et al., 2017). Em contrapartida, faixas neutras ou alcalinas de pH beneficiam o acúmulo de propionato, cuja produção consome H<sub>2</sub> (LEE et al., 2008; LEE et al., 2010). A literatura comumente reporta valores máximos de produção de biohidrogênio em valores de pH entre 5,0 e 6,0 (OH et al., 2004; FERNANDES et al., 2010; LIN et al., 2012; ROY et al., 2014; MAJHI e JASH 2016; CHAVADEJ et al., 2019). Essa faixa tende a favorecer a geração de acetato e butirato, aumentando a produção de hidrogênio (KAPDAN et al., 2006; PRAKABAR et al., 2018). Segundo a literatura, a faixa de pH comumente utilizada para fermentação da ARFM varia entre 5,0 e 6,0, (SREETHAWONG et al., 2010; ANDREANI et al., 2015; ANDREANI et al., 2019)

embora também tenham sido realizados estudos nos quais não houve correção do pH afluente (4,5) (TORRES et al., 2017).

Em relação à temperatura, é possível observar elevada produtividade de hidrogênio considerando-se a faixa mesofílica (30 °C – 40 °C), isso porque esse intervalo é comum ao metabolismo da maior parte dos microrganismos anaeróbios e garante estabilidade ao processo (KAINTHOLA et al., 2019; CREMONEZ et al., 2021). São reportados rendimentos elevados em condições termofílicas (> 40 °C), uma vez que temperaturas elevadas possibilitam a aplicação de COVs elevadas (15 – 80 kg m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>) e favorecem a hidrólise de substratos complexos (ZHENG et al., 2008; LUPTI et al., 2016; KAINTHOLA et al., 2019), embora possa ocorrer desnaturação das enzimas microbianas e a rápida degradação de compostos inibitórios, inibindo o crescimento celular (ARIMI et al., 2015; ERGAL et al., 2018; YANG e WANG, 2019). É possível aumentar a produtividade do biohidrogênio em condições termofílicas desde que utilizadas culturas microbianas que se desenvolvem em temperaturas mais elevadas, como *Thermotoga maritima* e *Pyrococcus furiosus*, por exemplo (PAWAR et al., 2013). No entanto, o uso de culturas puras e o gasto energético para manter reatores operando em elevadas temperaturas pode não ser vantajoso economicamente (ROY et al., 2014; LIN et al., 2018). Dessa forma, a maioria dos estudos são conduzidos na faixa entre 35 e 37 °C, inclusive quando a ARFM é utilizada como substrato (SREETHAWONG et al., 2010; ANDREANI et al., 2015; TORRES et al., 2017; ANDREANI et al., 2019).

Na fermentação, o tempo de detenção hidráulica (TDH), ou tempo de ciclo para reatores em batelada, depende de uma série de fatores como: velocidade de reação, temperatura de operação e tipo de substrato. Em reatores acidogênicos, o TDH pode variar de 2 a 24 h, dependendo do substrato a ser digerido (MORENO-ANDRADE et al., 2015; ROY e DAS, 2016), podendo ser reduzido no caso de substratos facilmente hidrolisáveis (KUMAR et al., 2016; PAREEK et al., 2020). No caso da ARFM o TDH pode ser de poucas horas (2 – 4 h) devido à presença de açúcares prontamente disponíveis em sua composição (TORRES et al., 2017; TONELLO et al., 2018; ANDREANI et al., 2019). Além disso, o TDH reduzido pode diminuir a quantidade de microrganismos consumidores de hidrogênio presentes no reator, que apresentam velocidade de crescimento em termos de dias, enquanto os microrganismos acidogênicos tem velocidade de crescimento em termos de horas (LIN, et al., 2018; YANG e WANG, 2019).

A produção de biohidrogênio em um sistema contínuo é dependente da COV, já que, cargas orgânicas mais elevadas, em termos de carboidratos ou DQO, podem aumentar a

eficiência da produção de hidrogênio. Em contrapartida, COVs elevadas podem aumentar a concentração de compostos inibitórios presentes no próprio substrato (FERNANDES et al., 2010; LIN et al., 2018; SANTANA-JUNIOR et al., 2019), ou mesmo aumentar a pressão parcial de H<sub>2</sub> no meio, ocasionando o desvio das rotas metabólicas e a diminuição ou até mesmo inibição da produção de hidrogênio (CABROL et al., 2017; EKER e SARP, 2017). O aumento na disponibilidade de alimento e a composição de substratos ricos em carboidratos facilmente hidrolisáveis também proporcionam aumento na concentração de ácidos orgânicos, o que reduz o pH do meio, e como consequência, pode diminuir a produção de hidrogênio (HAWKES et al., 2007). A literatura reporta COVs entre 9 e 80 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para reatores acidogênicos alimentados com ARFM, obtendo eficiências entre 25 - 43% de hidrogênio no biogás (SREETHAWONG et al., 2010; TORRES et al., 2017; CHAVADEJ et al., 2019).

O aumento da COV também proporciona aumento na disponibilidade de macronutrientes como nitrogênio e fósforo. Baixas relações C/N (excesso de nitrogênio) podem levar ao crescimento excessivo da biomassa em reatores acidogênicos, que provoca alterações nas vias metabólicas (SREETHAWONG et al., 2010; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; CORBARI et al., 2019). Uma vez que os microrganismos anaeróbios fermentativos consomem carbono de 25 a 30 vezes mais rápido do que o nitrogênio (KALIL et al., 2008; ELBESHBISHY et al., 2017), manter a proporção C/N adequada evita condições de inibição. Uma ampla faixa da relação C/N é relatada na literatura como sendo ideal (20 - 200) para produção de H<sub>2</sub>, o que se deve às variações nas condições operacionais, como temperatura, pH, inóculos e, principalmente, composição do substrato, embora para substratos facilmente fermentáveis utilizados em reatores com biomassa imobilizada sejam reportados valores próximos a 140 (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). Em relação à presença de nitrogênio, substratos com elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal podem inibir a fermentação (WANG e WAN, 2008). A amônia pode ser produzida adicionalmente por meio da biodegradação de compostos contendo nitrogênio orgânico, como ureia, proteínas e aminoácidos, e pode interferir no pH intracelular e provocar aumento da necessidade de energia para manutenção das células microbianas, inibindo as enzimas responsáveis pela produção de H<sub>2</sub> (LAY et al., 2005; BISAILLON et al., 2006; SALERNO et al., 2006; CASTRO et al., 2012). A forma não ionizada de amônia ou amônia livre (NH<sub>3</sub>) é a principal forma inibitória do nitrogênio, mas como a fermentação é operada em pH ácido (5,0 - 6,0), a maior parte da amônia permanece na forma ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que é menos tóxica (WANG e WAN et al., 2008).

Na Tabela 4 são apresentados estudos que utilizaram a ARFM como substrato em reatores acidogênicos destinados à produção de hidrogênio utilizando diferentes configurações

de reatores e estratégias operacionais. A ARFM apresenta variações em sua composição que podem afetar o desempenho do processo anaeróbio, o que contribui para que os estudos apresentados na Tabela 4 tenham divergências entre si. Andreani et al. (2019) utilizaram um reator AnSBBR com imobilização celular em aparas de polietileno de baixa densidade, variando a COV de 12 a 18 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. O reator apresentou produção máxima de hidrogênio (2,4 L L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) para COV de 14 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, no entanto, ao aumentar para 18 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, a produção de hidrogênio foi reduzida (0,45 L L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) devido à inibição dos microrganismos produtores de hidrogênio ocasionada pela presença de bactérias lácticas, que podem competir por substrato ou excretar metabólitos tóxicos que podem inibir as bactérias produtoras de hidrogênio.

Andreani et al. (2015), Torres et al. (2017) e Corbari et al. (2019) reportaram que instabilidades na produção de hidrogênio em reatores contínuos de leito fixo alimentados com ARFM, estão relacionadas ao crescimento excessivo da biomassa devido às elevadas concentrações de macronutrientes presentes no resíduo. Torres et al. (2017) verificaram que o aumento da COV de 9,5 para 13,5 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, aliado à redução da relação C/N (de 241 para 25), desencadeou a solventogênese (pH menor que 4,5) e contribuiu para redução da produção de hidrogênio de 248 para 144 mL L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. De acordo com os autores, a elevada concentração de nitrogênio no afluente proporcionou o crescimento excessivo da biomassa, causando redução na porosidade do leito e perda do volume útil do reator. Corbari et al. (2019), também observaram que a baixa relação C/N (43) proporcionou crescimento excessivo de microrganismos no reator, reduzindo a disponibilidade de substrato e a carga orgânica específica aplicada (COE<sub>A</sub>) de 5,3 para 0,6 gCarb g<sup>-1</sup>SSVd<sup>-1</sup>, ocasionando instabilidade na produção de hidrogênio. O equilíbrio nutricional da ARFM pode ser alcançado a partir da adição de cosubstratos (ROSA et al., 2016). No sentido de equilibrar as concentrações de nutrientes da ARFM, a adição de resíduos sólidos agroindustriais tem sido reportada na literatura como uma estratégia interessante (MONTROYA et al., 2020; XIONG et al., 2020; SOARES et al., 2020), que pode ser aprimorada a partir da utilização desses resíduos na imobilização celular, conforme abordado no item 3.2.

**Tabela 4** - Estudos comparativos com ARFM para produção de hidrogênio.

Configuração do reator	Inóculo	COV (gCarb L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TDH (h)	C/N	pH	T (°C)	εCarb (%)	Principais resultados	Referência
ASBR	LA	30	4	45	5,5	37	-	HY: 0,38 L gDQO <sup>-1</sup> ; PVH: 5,68 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> O excesso de nitrogênio (C:N = 100:4,4) resultou na redução da produtividade de H <sub>2</sub>	Sreethawong et al. (2010)
Batelada	LA	-	70	96	5,5	37	96	HY: 0,314L gDQO <sup>-1</sup> ; PVH: 0,32 mL h <sup>-1</sup> A taxa de conversão da matéria orgânica da ARFM resultou em uma recuperação energética de 0,59.10 <sup>9</sup> MJ ano <sup>-1</sup>	Lucas et al. (2015)
UAFBR	LA	35	3	38	6	36	93	HY: 0,84 L gCarb <sup>-1</sup> ; PVH: 1,1 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Baixas relações C/N contribuíram para o crescimento excessivo da biomassa, causando uma redução de 35% na produção de H <sub>2</sub>	Andreani et al. (2015)
UAFBR	LA	9,5	4	241	4,5	36	91	HY: 0,86 mol molCarb <sup>-1</sup> ; PVH: 0,25 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> O aumento da COV e redução do pH inicial contribuíram para o aumento da concentração de butanol em 1,8 vezes, diminuindo a PVH em 41,68% e o HY em 63,95%	Torres et al. (2017)
AnSBBR	LA	13,5	4	-	4,5	-	97	HY: 3,24 mol kgCarb <sup>-1</sup> ; PVH: 0,7 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> A redução do TDH de 4 h para 2 h proporcionou redução de 40% na PVH	Tonello et al. (2018)
AnSBBR	AF	12	4	-	6	30	82	HY: 1,5 mol kgCarb <sup>-1</sup> ; PVH: 0,45 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> A estratégia da batelada alimentada aumentou a PVH e HY.	Andreani et al. (2019)
UAFBR	AF	20	2	43	6	36	88	HY: 0,3 mol molCarb <sup>-1</sup> ; PVH: 0,55 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Foi verificado acúmulo de biomassa no reator e presença de CH <sub>4</sub> no biogás	Corbari et al. (2019)

UAFBR – *upflow anaerobic fixed bed reactor* (reator anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente); HY: *hydrogen yield* (rendimento de hidrogênio); PVH – produção volumétrica de H<sub>2</sub>; LA- lodo anaeróbio termicamente tratado; AF - Água residuária autofermentada.;

### 3.4 PRODUÇÃO DE METANO

A produção de biogás durante a digestão anaeróbia resulta em uma mistura que possui como principais componentes o metano e o dióxido de carbono, podendo apresentar ainda outros gases em concentrações menores, conforme indicado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Composição do biogás gerado a partir da DA em condições favoráveis à produção de CH<sub>4</sub>.

Composto	Percentual no biogás
Metano	50 – 70%
Dióxido de carbono	30 – 50%
Hidrogênio	1 – 3%
Oxigênio	0,1 – 1%
Sulfeto de hidrogênio	0,1 – 0,5
Monóxido de carbono	0 – 0,1%

Fonte: Adaptado de Hernández e Martín (2016).

Em sistemas anaeróbios em duas fases alimentados com substratos ricos em carboidratos, 60 - 70% do metano presente no biogás é oriundo principalmente da conversão do acetato (WU et al., 2016). A formação do acetato a partir de outros AOV depende da regulação da concentração de hidrogênio no meio. Isso ocorre a partir de relações sintróficas entre bactérias acetogênicas que convertem AOV em acetato e hidrogênio e arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, que consomem o H<sub>2</sub>, reduzindo a pressão parcial de hidrogênio estabelecendo assim condições termodinâmicas favoráveis para que essas reações ocorram (WILLIAMS et al., 2013; WANG et al., 2018a). Essa condição tende a ser otimizada pela separação da digestão anaeróbia em duas fases, conforme abordado no item 3.2. De acordo com Zhang et al. (2015), embora a condução da biodigestão em fases separadas quebre as relações sintróficas entre as populações microbianas atuantes no processo de degradação, esse processo permite melhorar as etapas limitantes da DA, principalmente relacionadas à hidrólise de compostos complexos e o acúmulo de ácidos orgânicos.

Diante dos benefícios destacados, a operação do sistema em duas fases pode proporcionar redução do tempo de partida da fase metanogênica e aumentar a capacidade operacional dos sistemas. Lullio et al. (2014) avaliaram a produção de metano em um sistema operado em fase única e em duas fases utilizando como substrato água residuária sintética acidificada a base de sacarose. O reator operado em fase única apresentou 61% de metano no biogás em um tempo de ciclo de 12 h, enquanto o reator em duas fases obteve maior produção

de metano (85%) em menor tempo de ciclo (8 h), uma vez que os AOV se encontravam facilmente disponíveis aos microrganismos acetogênicos.

Mari et al. (2020) avaliaram a produção de biohidrogênio e biogás a partir da ARFM em um sistema de duas fases composto por reatores AnSBBR. O reator acidogênico foi operado com COV de  $14 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e tempo de ciclo de 4 horas, sendo obtido rendimento médio de  $1,1 \text{ molH}_2 \text{ kg}^{-1}\text{Carb}$ . Enquanto o reator metanogênico, alimentado com o efluente do reator acidogênico, foi submetido ao aumento gradual da COV de 3,7 para  $12 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a diminuição do tempo de ciclo de 12 para 6 horas, sendo verificado rendimento médio de  $0,263 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$  para COV de  $12 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e tempo de ciclo de 6 h. Nessas condições, o sistema operado por Mari et al. (2020) apresentou tempo de ciclo reduzido quando comparado a sistemas de fase única, totalizando apenas 10 horas, das quais 4 h foram para o reator acidogênico e 6 h para o metanogênico, enquanto sistemas únicos comumente apresentam tempo de ciclo entre 16 h a dias de operação (WANG et al., 2009, SOARES et al., 2020).

Chavadej et al. (2019) avaliaram a produção de biohidrogênio e metano a partir da codigestão da ARFM e do bagaço de mandioca em um sistema de duas fases composto por reatores UASB operados em condições termofílicas ( $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O sistema foi operado com COV de  $10,29 \text{ kgDQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , variando-se a concentração de bagaço de 200 a  $1400 \text{ mg L}^{-1}$ . Os maiores teores de hidrogênio (43%) e metano (70%) no biogás e os maiores rendimentos de  $8 \text{ mLH}_2 \text{ g}^{-1}\text{DQO}$  e  $90,57 \text{ mLCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{DQO}$  foram obtidos com a adição de  $1200 \text{ g L}^{-1}$  de bagaço à ARFM. Os autores verificaram instabilidade na remoção de matéria orgânica e na produção de biogás quando a adição de bagaço foi superior a  $1200 \text{ mg L}^{-1}$ , possivelmente devido à toxicidade ocasionada pelo aumento na concentração dos ácidos orgânicos de 9000 para  $14600 \text{ mgHAc L}^{-1}$  no reator acidogênico.

#### 3.4.1 Fatores interferentes na metanogênese

Assim como os microrganismos acidogênicos, para que as arqueas metanogênicas tenham suas necessidades metabólicas atendidas, alguns parâmetros como pH, temperatura, mistura, carga orgânica volumétrica (COV), tempo de ciclo e imobilização da biomassa devem ser controlados a fim de assegurar condições ótimas para o crescimento desses microrganismos.

O pH ideal para as arqueas metanogênicas encontra-se na faixa de 6,8 a 7,5, próxima a neutralidade. Esses microrganismos são bastante sensíveis a variações do pH, uma vez que, a maioria das arqueas é suprimida em valores inferiores a 6,7, com exceção da *Methanosarcina sp.* (DEUBLIN e STEINHAUSER, 2008; VASQUEZ e VARALDO, 2009). A acidificação é

um problema comum em biodigestores anaeróbios, sendo um dos responsáveis pelo efeito inibitório sobre as bactérias acetogênicas, microrganismos essenciais para a produção de metano (KUNINOBU et al., 1999; WANG et al., 2018a). Isso ocorre quando há sobrecarga orgânica e desequilíbrio na manutenção da concentração de hidrogênio no meio, reduzindo o pH e afetando as interações microbianas durante a digestão anaeróbia, principalmente em reatores de fase única. Em valores de pH inferiores a 6,5 o ácido acético acumulado encontra-se não-ionizado e se torna tóxico aos microrganismos, ocasionando o acúmulo de AOV no reator (STAMATELATOU et al., 2003).

Para controle do pH e da alcalinidade em reatores anaeróbios, comumente são empregados alcalinizantes como NaOH e NaHCO<sub>3</sub> (BEZERRA et al., 2011; LULLIO et al., 2014). O uso desses materiais é vantajoso para correção do pH, embora apresentem custos elevados quando considerados reatores operados em escala industrial. O uso do NaOH e NaHCO<sub>3</sub> no ajuste do pH e no tamponamento de reatores anaeróbios pode ser substituído pela recirculação do efluente (NANDY et al., 2002); uso de ureia (BONCZ et al., 2012) e dolomitas (PALMA et al., 2018), no entanto, os alcalinizantes químicos prevalecem na maioria dos estudos. A ARFM e o efluente do reator acidogênico apresentam caráter ácido, com pH na faixa de 4,5 a 6,0, sendo necessário o ajuste na faixa neutra para ser inserido no reator metanogênico. Caso contrário, não favorecerá os microrganismos metanogênicos, afetando tanto a produção de metano como a remoção de matéria orgânica. Nesse sentido, estudos que utilizam ARFM como substrato em sistemas de uma e duas fases (FLECK et al.; 2017; AMORIM et al., 2018; MARI et al., 2020) reportam o ajuste do pH afluente (7,0) antes da entrada do reator metanogênico.

A temperatura afeta diretamente a sobrevivência e crescimento dos microrganismos, uma vez que, influencia as reações metabólicas, o equilíbrio iônico, a solubilidade dos substratos e a disponibilidade de nutrientes no meio (AKYOL et al., 2016; FERGUSON et al., 2016). A metanogênese pode ocorrer em diferentes faixas de temperatura, pela ação de microrganismos psicrófilos (0 - 20 °C), mesófilos (20 – 45 °C) e termófilos (45 - 60 °C) (WANG et al., 2018). Apesar das arqueas metanogênicas serem bastante restritivas em relação à temperatura, há muitos estudos que consideram a produção de biogás em reatores termofílicos, principalmente em águas residuárias que saem aquecidas do processo industrial, como a vinhaça por exemplo (FERRAZ-JUNIOR et al., 2016), embora eleve o custo do processo. No caso da ARFM, a metanogênese comumente é conduzida na faixa mesofílica (30 a 37 °C), conforme reportado por Intanoo et al. (2016), Watthier et al. (2019) e Mari et al. (2020), embora

alguns estudos reportem elevados rendimentos em condições termofílicas, como Chavadej et al. (2019).

Para que a produção de biogás aconteça, é necessário um intenso contato entre substrato e biomassa para que as enzimas microbianas possam agir e, dessa forma, metabolizar os nutrientes e a matéria orgânica presentes no meio (ZAIAT et al., 2001). A agitação é um parâmetro relacionado à configuração do reator, pode ser mecânica, pela recirculação do efluente ou do próprio biogás. A agitação não pode ser excessiva pois pode provocar o cisalhamento do biofilme, afetando negativamente a decomposição anaeróbia (NOVAES et al., 2010; LIU et al., 2017). Na prática, o equilíbrio deste processo pode ser obtido por meio de agitadores que exercem baixas forças de cisalhamento (ZAIAT et al., 2001). A mistura é ainda mais importante em reatores anaeróbios com biomassa imobilizada, para que ocorra transferência de massa entre substrato e microrganismos (RATUSZNEI et al., 2000; BEZERRA et al., 2011). Não há consenso em relação à intensidade de agitação em reatores metanogênicos. Cubas et al. (2011) avaliaram o efeito da intensidade da agitação mecânica (100 a 1100 rpm) a partir de impelidores do tipo turbina de pás planas sobre a eficiência de remoção de matéria orgânica em um AnSBBR alimentado com água residuária sintética ( $530 \pm 37$  mgDQO L<sup>-1</sup>), com tempo de ciclo de 8 h e temperatura de 30 °C. De acordo com os autores, o reator alcançou eficiência de remoção de matéria orgânica em torno de 87% em todas as condições investigadas. Ainda segundo os autores, a agitação mecânica entre 300-900 rpm é promissora na produção de biogás, com possibilidade de produção de metano e remoção de matéria orgânica, devido ao maior contato entre microrganismos e nutrientes facilmente disponíveis no substrato. Volpini et al. (2018) e Mari et al. (2020) testaram a recirculação como mecanismo de agitação, com velocidade de  $0,19 - 0,2$  cm s<sup>-1</sup> em AnSBBR alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar e ARFM, respectivamente, e obtiveram produtividade de metano de  $133,1$  molCH<sub>4</sub> m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> e  $2,71$  LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente.

De acordo com Liu et al. (2017), a produção de metano tende a aumentar com o incremento de carga orgânica, devido à maior disponibilidade de alimento aos microrganismos. Em sistemas de fase única em condições de sobrecarga orgânica podem proporcionar inibição da metanogênese, uma vez que, causa desequilíbrio entre os microrganismos acidogênicos e metanogênicos, seguido de acúmulo de ácidos e redução do pH, de modo que, quando a acidificação se torna irreversível, pode resultar no colapso do reator (WANG et al., 2018a). Dessa forma, com a separação da DA em duas fases, é possível manter a estabilidade do reator mesmo com a aplicação de cargas mais elevadas. Lullio et al. (2014) avaliaram a produção de metano em reatores AnSBBR alimentados com água residuária sintética acidificada, variando-

se a carga orgânica, o tempo de ciclo e a concentração afluenta. Os resultados demonstraram que o aumento da carga orgânica volumétrica aplicada (de 2,15 para 4,74 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) a partir do aumento da concentração afluenta de 1 para 2 gDQO L<sup>-1</sup>, sem alteração do tempo de ciclo (6 horas) resultou em diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica de 96 para 86%. Em contrapartida, o aumento da COV aplicada de 4,74 para 5,44 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, com a redução do tempo de ciclo (de 8 para 6 horas), possibilitou a recuperação do desempenho do reator, alcançando 95% de eficiência de remoção de DQO. A maior produção de biogás ocorreu para as maiores COVs testadas, alcançando rendimentos de até 0,016 molCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>.

Pesquisas que abordaram a produção de metano a partir da ARFM reportaram maiores rendimentos para COVs que variaram de 8 a 15 gDQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (INTANOO et al., 2014; WATTHIER et al., 2019; PALMA et al., 2018; MARI et al., 2020), isso ocorre em detrimento da remoção de matéria orgânica, uma vez que, o aumento da COV pode estar relacionado à redução do tempo de ciclo ou TDH, diminuindo o tempo hábil para remoção de matéria orgânica pelos microrganismos (INTANOO et al., 2014; LIU et al., 2017). Em relação aos sistemas de duas fases alimentados com ARFM, Mari et al. (2020), obtiveram rendimentos de metano de até 263 mL g<sup>-1</sup>DQO para COV de aproximadamente 12 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. A Tabela 6 apresenta estudos que utilizaram a ARFM como substrato em reatores metanogênicos utilizando diferentes configurações e estratégias operacionais.

O uso de materiais lignocelulósicos como suporte tem sido reportado na literatura como uma alternativa sustentável aos materiais inertes (LIU et al., 2020), além de contribuir para o equilíbrio de nutrientes essenciais para síntese celular, crescimento e reações metabólicas (WANG et al. 2018). Entre os macronutrientes, o fósforo é essencial para formação de ácidos nucleicos e dos fosfolipídeos, enquanto o nitrogênio é fundamental para a síntese de ácidos nucleicos e de aminoácidos (VENKITESHWARAN et al., 2015; WANG et al., 2018a). Nesse sentido, as relações C/P ( $\leq 150$ ) e C/N (20-30) equilibradas contribuem para a produção de biogás (MOSEY, 1983). Desbalanços nutricionais podem ocorrer, por exemplo, em casos de relações C/N elevadas (acima de 30) nas quais o nitrogênio é rapidamente consumido, ao ser direcionado para síntese celular dos microrganismos, com consequente redução na produção de metano (CHANDRA et al., 2012). Por outro lado, relações muito baixas (inferiores a 20) contribuem para o acúmulo de amônia, elevando o pH do meio e prejudicando a geração de metano (CHANDRA et al., 2012).

**Tabela 6** - Estudos comparativos com ARFM para produção de metano.

Configuração do reator	Sistema	COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TDH (h)	C/N	pH	T (°C)	εDQO (%)	Principais resultados	Referência
UASB	DF	15	-	-	5,5	55	72	MY: 164 mL g <sup>-1</sup> DQO e teor de 68% de CH <sub>4</sub> no biogás	Intanoo et al. (2014)
UASB	DF	8	-	-	-	37	93	MY: 115 mL g <sup>-1</sup> DQO; PVM: 0,91 LCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> Inibição dos microrganismos em concentrações de AOV acima de 400mg L <sup>-1</sup>	Intanoo et al. (2016)
AFBR	UF	5,6	65	-	5,5	26	99	Produção de biogás: 1,4 L L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> O reator manteve a estabilidade após 450 dias de operação	Wattier et al. (2019)
UASB	DF	10,29*	12	85	-	55	76	MY: 100 mL g <sup>-1</sup> DQO; Teor de 70,5% de CH <sub>4</sub> no biogás Vazão de CH <sub>4</sub> : 20 L d <sup>-1</sup> , para adição de 1200 mg de resíduos da mandioca, obtendo COV de 13,4 gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Chavadej et al. (2019)
ARHF	UF	3,0	74	26	5,0	28,5	95	MY: 0,29 L g <sup>-1</sup> DQO; Rendimento de Biogás: 0,48 L g <sup>-1</sup> DQO A estabilidade foi alcançada com o uso de dolomita como material alcalinizante	Palma et al. (2018)
AnSBBR	DF	12	6	-	7,0	30	60	MY: 263 mL g <sup>-1</sup> DQO; PVM: 2,71 LCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ; Teor de 78% de CH <sub>4</sub> no biogás	Mari et al. (2020)
ASBR	DF	0,075**	600	-	7,0	-	10	Rendimento de biogás e CH <sub>4</sub> com percentuais de 56,1% e 9%, respectivamente	Ismail et al. (2021)

DF – sistema de duas fases; UF – sistema de fase única; ARHF: *Anaerobic Horizontal Flow reactor*; MY: *methane yield* (rendimento de metano); PVM – produção volumétrica de CH<sub>4</sub>; \*Com adição de 1200 mg de resíduos da mandioca; \*\* Autores utilizaram apenas resíduos da mandioca (pele + rama) e lodo anaeróbio.

Na metanogênese, os cosubstratos devem ter características como capacidade tampão, para manutenção do pH do meio; concentrações de nutrientes que proporcionem condições equilibradas aos microrganismos; baixa concentração de nitrogênio para evitar inibição por amônia; baixa concentração de sulfato para evitar proliferação de bactérias redutoras de sulfato; e fração orgânica biodegradável (XIE et al., 2016). Conforme abordado no tópico 3.2.1, o uso de materiais lignocelulósicos como suporte, pode ter como consequência a codigestão desse material, que apresenta benefícios como a diluição de substâncias tóxicas; efeitos sinérgicos entre os microrganismos; aumento do conteúdo orgânico biodegradável e maior rendimento de metano por unidade de volume do reator (SHAH et al., 2015). O balanço de nutrientes proporcionado pela codigestão de substratos com características complementares torna a comunidade microbiana mais resistente a perturbações no meio, aumentando a produção de biogás e metano (XIONG et al., 2020, MENDIETA et al., 2020).

#### 3.4.2 Estratégias para otimização da produção de metano: a adição de biocarvão

Embora a DA seja um processo consolidado, a adição de materiais como o biocarvão que estimulam a condutividade elétrica é uma das técnicas recentemente utilizadas no aprimoramento do processo visando o aumento da produção de metano (FAGBOHUNGBE et al., 2017; ZHANG et al. 2017; ZHANG et al., 2020; QI et al., 2021; WANG et al., 2021a).

O carvão ativado é um dos principais condutores utilizados para aumentar a eficiência da metanogênese, devido a sua elevada área superficial e condutividade elétrica (DANG, et al., 2016; RASAPOOR et al., 2020). No entanto, pesquisas recentes demonstraram que o biocarvão não ativado tem propriedades redox ativas, tornando-o tão eficaz quanto o ativado (CHEN et al., 2014; SHEN et al., 2017). Biocarvão ou *biochar* (BC) é o resíduo carbonáceo derivado da conversão térmica da biomassa submetida a processos como pirólise (faixa de 300 – 700 °C), gaseificação, carbonização hidrotérmica e torrefação - sem qualquer forma de ativação, resultando em um material poroso e estável (QAMBRANI et al., 2017; FAGBOHUNGBE et al., 2017). O fato de o material não ser ativado torna a área superficial do BC menor e menos eficiente em termos de adsorção, quando comparado ao carvão ativado, mas em termos de custos de produção, o biocarvão é menos custoso (LINVILLE et al., 2017, SUN et al. 2019). A composição química desse material varia conforme sua origem, como quando derivado do lodo de esgoto e do esterco de aves e suínos, haverá maior concentração de grupos de nitrogênio e enxofre quando comparado ao biocarvão de origem lignocelulósica (KIZITO et al., 2015).

A produção de BC a partir de materiais lignocelulósicos tem se tornado atrativa, devido à dificuldade de degradação desse tipo de resíduo. Ao ser submetido ao processo de pirólise, a estrutura lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina) sofre alterações como desidratação, reticulação, despolimerização, fragmentação e rearranjo, gerando por fim materiais como bio-óleo, gás de síntese (syngas) e o biocarvão (RASAPOOR et al., 2020; QI et al., 2021).

A adição de biocarvão à DA apresenta vantagens como adsorção de compostos inibitórios, controle de alcalinidade do sistema e a doação de elétrons entre espécies a partir da colonização do BC por microrganismos (FAGBOHUNGBE et al., 2017; MASEBINU et al., 2019). Dessa forma, em situações de choque de carga, com a possibilidade de acidificação de reatores metanogênicos, o biocarvão pode proteger os microrganismos das variações no pH e, em seguida, alterar a via metabólica por meio da doação de elétrons (CHEN et al., 2014). A doação direta de elétrons interespecies (*direct interspecies electron transfer* – DIET) ocorre devido à aromaticidade do BC, que é uma consequência do deslocamento de elétrons entre anéis aromáticos, o que confere propriedades condutoras ao grafite, carvão ativado, biocarvão ou outros polímeros orgânicos. A velocidade de transferência de elétrons na DIET é aproximadamente  $10^6$  vezes mais rápida que a transferência de elétrons interespecies mediada (MIET) por outros doadores de elétrons como o  $H_2$ , o que possibilita a rápida conversão do substrato e seus intermediários (VIGGI et al., 2014; ROTARU et al. 2014). Materiais com aromaticidade aumentada podem atuar como doadores e receptores de elétrons. Se o microrganismo receptor reduzir seções do biocarvão e o microrganismo doador oxidar seções do BC, haverá diferenças de carga intrínseca entre as seções do BC, promovendo o fluxo de elétrons (CHEN et al. 2014).

A DIET possui dois mecanismos de transferência de elétrons: por meio de componentes biológicos presentes nos próprios microrganismos, como citocromos do tipo c e por meio de *pili* condutores (QIU et al. 2019). No primeiro mecanismo, os elétrons são doados diretamente para os aceptores via citocromo c, localizados na membrana celular dos microrganismos doadores (LEANG et al. 2003; LEANG et al. 2010). No segundo mecanismo, elétrons extracelulares são transferidos através de *pili* e outros apêndices celulares (WEBER et al. 2006; SUMMERS et al., 2010). Os *pili* condutores são filamentos de proteínas produzidos pelos microrganismos que, em condições adequadas, são responsáveis pela transferência de elétrons de longo alcance (WEBER et al., 2006). No entanto, a adição de materiais condutores ao digestor anaeróbio pode estimular a DIET em várias espécies de microrganismos, mesmo as que não possuem nanofios condutores (QIU et al. 2019).

A DIET está intimamente relacionada à condutividade elétrica e à propriedade redox ativa do biocarvão (RASAPOOR et al., 2020), que se correlacionam positivamente com os grupos funcionais presentes em sua superfície e estruturas. O BC possui três grupos funcionais principais que atuam na metanogênese, os alifáticos, oxigenados e aromáticos, que podem ser aumentados conforme a temperatura de pirólise, entre 300 – 700 °C (XUE et al., 2015). O aumento dos grupos aromáticos está relacionado à melhoria da condutividade do BC (YOU et al., 2017), promovendo a eficiência da DIET, o que contribui para redução da fase lag na digestão anaeróbia. Além disso, grupos funcionais alcalinos presentes na composição do biocarvão aumentam a alcalinidade do material (PANDEY et al., 2020), auxiliando na estabilização das condições de digestão, pois durante o processo de pirólise, com o aumento da temperatura em até 700 °C, os grupos funcionais de ácido carboxílico se decompõem em CO<sub>2</sub> ou CO para serem removidos gradualmente. Nessa faixa de temperatura, os grupos metil (–CH<sub>3</sub>) e metileno (–CH<sub>2</sub>) desaparecem, mas a estrutura do anel aromático e o grau de aromatização aumentam, levando a uma melhora na estabilidade do material e na condutividade elétrica do BC (MCBEATH et al., 2011).

A utilização do BC como material condutivo para aumentar a produção de metano na DA, tem sido explorada na literatura principalmente a partir da codigestão de resíduos de alimentos e lodo anaeróbio. No entanto, não foram reportados estudos considerando a adição de biocarvão à DA de águas residuárias agroindustriais, como a ARFM, o que destaca a relevância do presente estudo. Shen et al. (2017) analisaram a produção de metano em sistemas DF (frascos de 500 mL com COV de 1gSVT L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) a partir da comparação entre dois tipos de biocarvão: BC de palha de milho e BC de serragem. Os autores verificaram percentuais de 81% de metano no biogás e rendimentos de metano de 0,28 - 0,34 LCH<sub>4</sub> g SVT<sup>-1</sup> (BC de palha de milho) e 0,26 - 0,32 LCH<sub>4</sub> g SVT<sup>-1</sup> (BC de serragem), enquanto no frasco sem adição de BC o rendimento foi de 0,23 - 0,28 LCH<sub>4</sub> g SVT<sup>-1</sup>. Além disso, os autores relataram predominância do gênero *Methanosarcina* nos ensaios em que houve adição de BC, nos quais também foi verificado o aumento de até 33 vezes na concentração de micro e macronutrientes como P, K, Ca, Mg e Fe.

Wang et al. (2021a) avaliaram o comportamento de dois reatores UASB alimentados com água residuária sintética e submetidos ao choque de carga orgânica (20 e 80 kg DQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>). O experimento comparou o comportamento dos reatores quanto a adição (4 g L<sup>-1</sup>) ou não de *biochar*. De acordo com os autores, após 24 h, o reator sem adição de BC apresentou baixa produção de biogás (0,08 ± 0,01 m<sup>3</sup> kg DQO<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e teor de metano no biogás

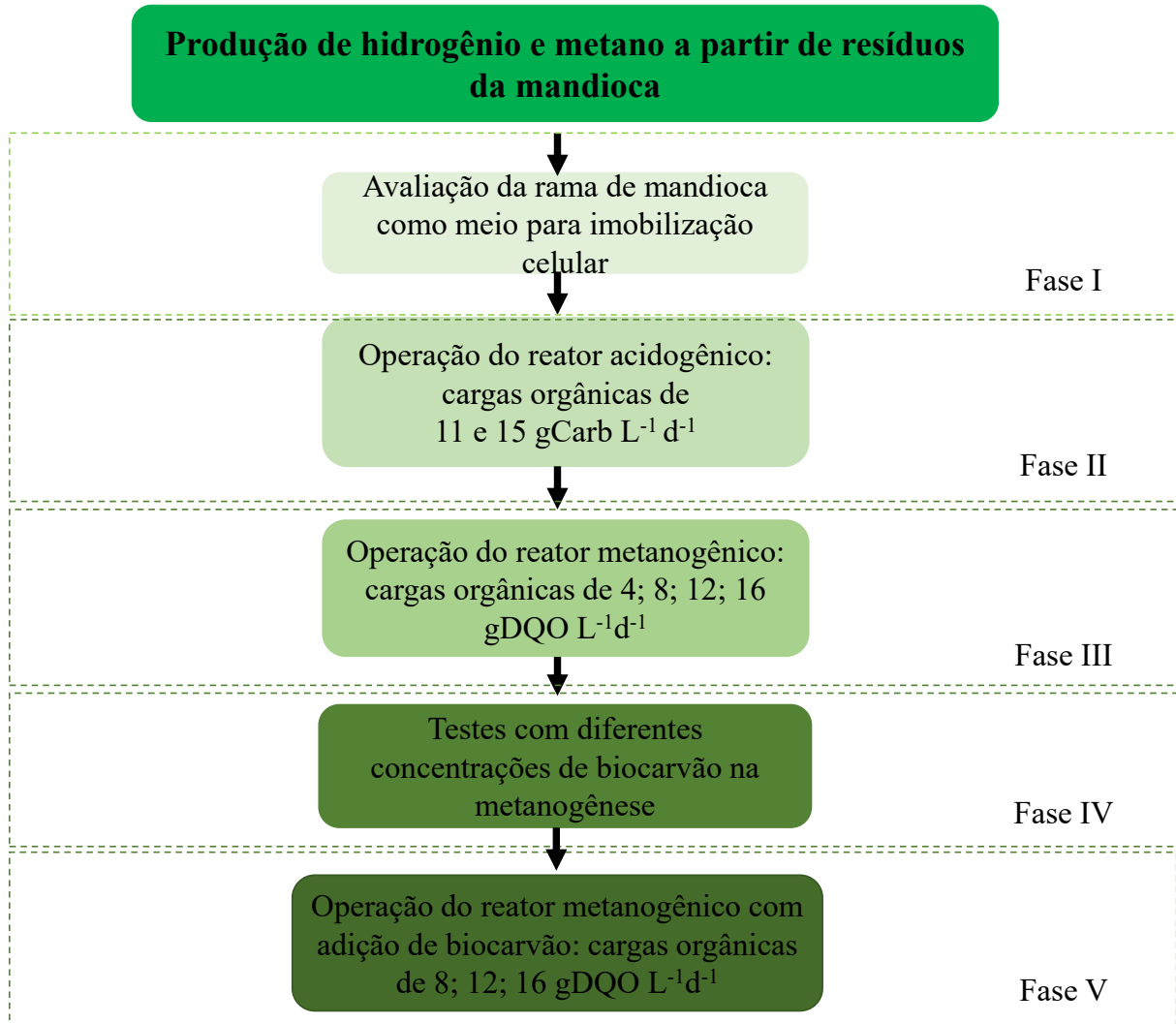
de 44%, devido a acidificação do meio (pH de 5,42). Em contrapartida, a produção de biogás no reator com BC foi estável ao longo dos 100 dias de operação, com rendimento médio de  $0,33 \pm 0,04 \text{ m}^3 \text{ kg DQO}^{-1}$ , teor de metano no biogás de 57% e o pH do meio manteve-se em  $7,01 \pm 0,22$ . Wang et al. (2021a) verificaram que houve adesão de microrganismos ao *biochar*, principalmente das *arqueas Metanosaeta* e *Metanosarcina* o que contribuiu para manutenção da estabilidade estrutural do lodo granular no reator, mesmo em condições de sobrecarga orgânica.

### 3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-se nas informações encontradas na literatura, algumas das principais limitações verificadas durante a produção de hidrogênio e metano a partir de águas residuárias agroindustriais estão relacionadas ao crescimento excessivo de microrganismos no reator acidogênico, a acidificação do reator metanogênico ocasionado pelo aumento da carga orgânica volumétrica e o desbalanço nutricional da ARFM. Buscando soluções para os problemas relatados, essa pesquisa explorou opções para maximizar o aproveitamento energético dos resíduos do processamento da mandioca a partir de um sistema anaeróbio operado em duas fases, no qual foram aplicadas cargas elevadas e tempos de ciclo reduzidos. Aliado à separação de fases, o uso de reatores anaeróbios com biomassa imobilizada em matrizes sustentáveis e lignocelulósicas também é uma estratégia para reduzir as instabilidades relacionadas ao crescimento excessivo de microrganismos. A partir do uso de material lignocelulósico para a imobilização celular, buscou-se também o equilíbrio de nutrientes no sistema acidogênico e metanogênico considerando a codigestão entre a água residuária e as ramas de mandioca adicionadas como suporte. Por fim, o uso de materiais condutivos, como o biocarvão, é uma abordagem recente e pode potencializar a produção de metano. O presente estudo busca aliar diferentes estratégias na valorização dos resíduos da mandioca com enfoque sustentável na geração de biocombustíveis ( $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ ) e na redução do impacto ambiental dos resíduos gerados no processo, contemplando a diminuição da concentração de matéria orgânica da água residuária, bem como a menor geração de resíduos do material de imobilização, uma vez que poderá ser degradado ao longo do tempo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A operação do sistema em duas fases e parte das análises físico-químicas foram desenvolvidas no Laboratório de Saneamento da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A Figura 3 apresenta o fluxograma com as 5 fases do projeto.



**Figura 3** - Fases desenvolvidas ao longo do experimento.

### 4.1 AVALIAÇÃO DA RAMA DE MANDIOCA COMO MEIO PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR (FASE I)

#### 4.1.1 Substrato e Inóculo

O substrato utilizado neste ensaio consistiu em água residuária sintética (AS), à base de sacarose (2000 mg L<sup>-1</sup>) e uréia (11,6 mg L<sup>-1</sup>), com adição de uma solução composta pelos seguintes micronutrientes: NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O (1,25 mg L<sup>-1</sup>); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (125 mg L<sup>-1</sup>); FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O

(1,03 mg L<sup>-1</sup>); CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (20 mg L<sup>-1</sup>); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,68 mg L<sup>-1</sup>); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (650 mg L<sup>-1</sup>); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,35 mg L<sup>-1</sup>) e NaHCO<sub>3</sub> (125 mg L<sup>-1</sup>) (Del Nery, 1987). O lodo anaeróbico utilizado como inóculo (55 gSSV L<sup>-1</sup>) foi coletado na lagoa anaeróbia de uma indústria de fécula de mandioca localizada no Noroeste do Paraná, Brasil. Após a coleta, o material foi peneirado e mantido sob refrigeração até o uso (4 °C). Para eliminar os microrganismos consumidores de hidrogênio, o lodo anaeróbico foi submetido ao aquecimento a 95 °C durante 15 minutos (SREETHAWONG et al., 2010).

#### 4.1.2 Preparo do material suporte e imobilização celular

A rama de mandioca (CS - sigla referente ao termo em inglês *Cassava Stem*, Figura 4) foi submetida aos processos de hidrólise alcalina (NaOH) e ácida (ácido cítrico e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), em concentrações de 5, 10 e 15% (v / v) e a hidrólise a vapor. No entanto, tanto o ácido sulfúrico quanto o hidróxido de sódio dissolveram parcialmente a rama da mandioca mesmo quando foi aplicada a menor concentração testada (5%, v / v). Como um dos objetivos da hidrólise era alterar a cristalinidade da estrutura lignocelulósica e promover a imobilização celular, o uso do ácido sulfúrico e do hidróxido de sódio foram descartados, uma vez que, destruíram parte do material, inviabilizando o uso da rama como material suporte. A partir desses resultados, foram avaliadas a hidrólise com ácido cítrico e a hidrólise à vapor (RAMPRAKASH e MUTHUKUMAR, 2015). Para a hidrólise ácida (AH), 60 g da rama (1 cm x 1 cm) foram misturadas à uma solução de ácido cítrico (5%, v / v) e autoclavadas por 1 hora (121°C, 1 atm), sendo posteriormente mantidas em temperatura ambiente até seu uso. A hidrólise a vapor (VH) consistiu em autoclavar amostras da rama (60 g) à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm por 15 minutos, seguida de rápida descompressão. Posteriormente, foram determinados os teores de glicose, lignina, celulose e hemicelulose nas amostras não hidrolisadas e nas amostras submetidas à hidrólise ácida e a vapor.



**Figura 4** - Rama de mandioca: a) in natura; b) após a hidrólise ácida; c) após a hidrólise a vapor.

Os ensaios para determinar a eficiência da imobilização celular foram conduzidos nas CS hidrolisadas (AH e VH) e não hidrolisadas (NH). As amostras foram inoculadas com lodo

anaeróbio previamente tratado ( $\sim 10 \text{ gSSV L}^{-1}$ ) e, posteriormente, foram submetidas à incubação em *shaker* da marca Marconi (modelo MA- 420). Para garantir a fixação dos microrganismos ao meio suporte, essa mistura permaneceu sob agitação de 300 rpm e temperatura de 35 °C por 96 h.

#### 4.1.3 Produção de hidrogênio

Os testes foram realizados em frascos Duran de 2 L nos quais foram inseridos 60 g da amostra (NH, AH e VH) previamente inoculada, enquanto no frasco controle foram inseridos aproximadamente  $10 \text{ gSSV L}^{-1}$  de inóculo. Em seguida, foram adicionados 800 mL de água residuária sintética e o pH foi ajustado para 6,0 utilizando-se bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Aproximadamente 1,0 L de *headspace* foi mantido. Os frascos foram fluxionados com nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), para estabelecer condições anaeróbias, lacrados com septo de borracha e incubados durante 24 h à temperatura de 35°C sob agitação constante (200 rpm). O volume de gás gerado foi medido por meio de deslocamento líquido, no qual o *headspace* de cada frasco foi conectado a um frasco de vidro preenchido com uma solução composta por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3%, v/v) e NaCl (25%, m/v), para evitar a solubilização dos constituintes do biogás na fase líquida (PALMA et al., 2018). O volume final do gás foi obtido após correção para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As variáveis resposta incluíram: eficiência de remoção de carboidratos ( $\text{ECarb}$ , em%), produção volumétrica de biogás (PVB,  $\text{L L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), produção volumétrica de hidrogênio (PVH,  $\text{LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), rendimento de hidrogênio por carga aplicada (HY,  $\text{mLH}_2 \text{ g}^{-1}\text{Carb}$ ) e a imobilização celular verificada a partir da biomassa aderida ao material suporte ( $\text{gSVT gsuporte}^{-1}$ ) e análise das estruturas presentes na rama de mandioca por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Determinada a melhor condição de imobilização celular, iniciou-se a operação do reator acidogênico (RA).

## 4.2 REATOR ACIDOGÊNICO (FASE II)

### 4.2.1 Reator e aparato experimental

O reator acidogênico (Figura 5) foi mantido em *shaker* (marca Marconi, modelo MA-420) à temperatura de 35 °C e agitação de 300 rpm. Suas medidas foram 15 cm de diâmetro e 30 cm de altura, com capacidade de 5 L, sendo 3,3 L de volume reacional (0,8 L de volume residual e 2,5 L de volume alimentado), 0,5 L de volume ocupado pela biomassa imobilizada e 1,2 L de *headspace*. O reator foi operado em bateladas sequenciais com tempos de enchimento e de esvaziamento de aproximadamente 10 minutos. Na parte superior do reator se localizavam

as saídas de gás e do efluente, além de um manômetro (marca Makil) para medição da pressão no interior do reator. O volume de gás foi medido diariamente por meio de um sistema de deslocamento de líquido conectado a saída de gás do reator. O gasômetro foi preenchido com uma solução composta por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3%, v/v) e NaCl (25%, m/v) (PALMA et al., 2018). O volume final foi obtido após correção para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). O efluente do reator acidogênico foi coletado a cada ciclo e mantido sob refrigeração ( $-4\text{ }^\circ\text{C}$ ) para posterior abastecimento do reator metanogênico.



**Figura 5-** Esquema do reator acidogênico – a) Sistema de incubação; b) Reator acidogênico.

#### 4.2.2 Substrato

O reator acidogênico foi alimentado com água residuária de fecularia de mandioca (ARFM) de uma indústria de processamento da mandioca para produção de fécula, localizada na região noroeste do Paraná. A ARFM foi coletada na entrada do sistema de tratamento de efluentes, que antecede a lagoa anaeróbia. Após a coleta, o efluente foi peneirado para retirada de eventuais partículas sólidas, caracterizado e mantido a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  até o seu uso. Ao longo do experimento foram coletados 4 lotes de ARFM, cuja caracterização é apresentada na Tabela 7.

**Tabela 7** - Composição da ARFM bruta.

Parâmetros	Lotes da ARFM*			
	1	2	3	4
pH	4,32	5,11	5,31	5,71
DQO (g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	6,1	8,12	11,08	9,8
Carboidratos (g L <sup>-1</sup> )	2,9	4,83	8,68	6,1
Sólidos Totais (g L <sup>-1</sup> )	5,2	6,11	8,2	7,3
Sólidos Voláteis Totais (g L <sup>-1</sup> )	3,9	4,89	6,9	6,11
Nitrogênio total – NTK (g L <sup>-1</sup> )	0,10	0,08	0,18	0,19
Fósforo total (g L <sup>-1</sup> )	0,04	0,02	0,06	0,03
Ácido acético (mgDQO L <sup>-1</sup> )	319	550	650	593
Ácido láctico (mgDQO L <sup>-1</sup> )	213	158	368	236
Ácido propiônico (mgDQO L <sup>-1</sup> )	151	ND	ND	ND
Etanol (mgDQO L <sup>-1</sup> )	521	406	589	414
**Metabólitos totais (mgDQO L <sup>-1</sup> )	1250	1115	1629	1245

\* Baseado em valores médios; \*\* Total de ácidos orgânicos e etanol presentes na ARFM; DQO – Demanda Química e Oxigênio; ND – Não detectados

#### 4.2.3 Inóculo e condições operacionais

A imobilização celular ocorreu conforme o item 4.1.2, utilizando o melhor resultado do pré-ensaio da Fase I como material suporte. Inicialmente, foram inseridos no reator 100 g do material suporte previamente inoculado. Durante a aclimação da biomassa, o reator foi operado com tempo de ciclo de 4 h, concentração afluyente de 5gCarb L<sup>-1</sup> e pH ajustado para 6,0 com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). Nos ensaios I e II, a carga orgânica volumétrica aplicada foi determinada em função da concentração de carboidratos no afluyente (5gCarb L<sup>-1</sup>) e do tempo de ciclo (4 e 3 h), conforme Tabela 8.

**Tabela 8** - Resumo das condições experimentais para produção de hidrogênio na fase acidogênica.

Ensaio	Lote ARFM	C/N	C/P	Metabólitos Totais* (mg L <sup>-1</sup> )	COV (gCarb L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo de ciclo (h)	Total de ciclos monitorados
I	2 e 3	96±23	535±68	516±46	11	4	180
II	3 e 4	112±11	500±27	498±28	15	3	180

\*Ácidos orgânicos e álcoois em calculados em função da DQO.

O primeiro lote da ARFM foi utilizado apenas no período de aclimação. Os lotes 3 e 4 foram diluídos para atingir a concentração afluyente determinada. Os indicadores de desempenho do reator para a produção de biohidrogênio foram determinados conforme descrito no item 4.5.

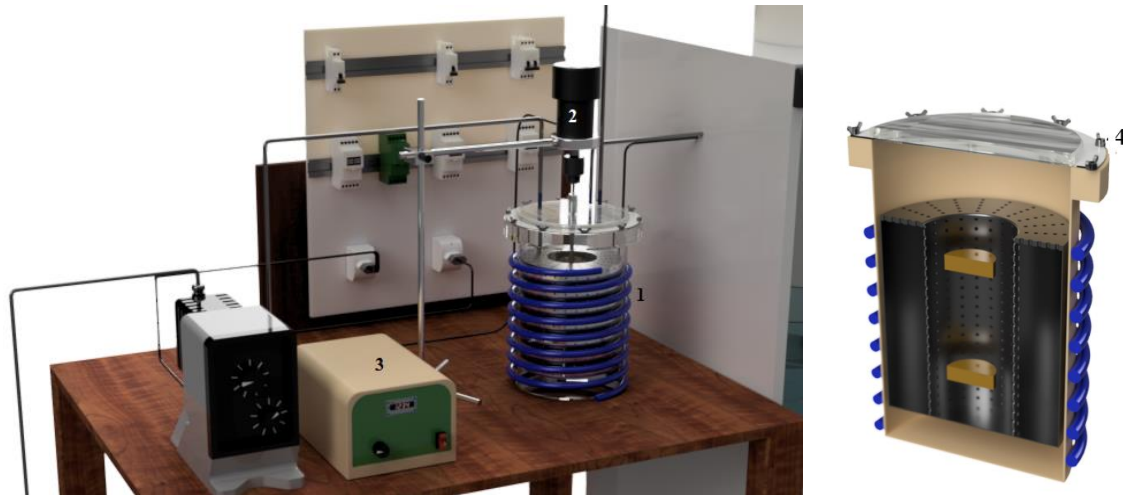
### 4.3 AnSBBR METANOGENICO (FASE III)

#### 4.3.1 Reator metanogênico e aparato experimental

O reator (Figura 6) foi confeccionado em acrílico transparente com 5 mm de espessura, 30 cm de altura e 20 cm de diâmetro interno. A capacidade total do reator foi de 7 L, sendo 5,2 de volume reacional (1 L de volume residual e 4,2 L de volume alimentado por ciclo), aproximadamente 0,8 L de volume ocupado pela biomassa imobilizada e 1,0 L de *headspace*. O material suporte foi acondicionado em um cesto de aço Inox perfurado de 20 cm de altura, 7 cm de diâmetro interno e 15 cm de diâmetro externo. O sistema de agitação foi composto por rotores do tipo turbina com 6 cm de diâmetro total, que consistiram em 2 conjuntos de 4 pás cada, instalados a uma distância de 8 cm e 16 cm do fundo do reator, operados a velocidade de 300 rpm. Para manter a temperatura a 35 °C, o reator foi envolto em uma serpentina com água aquecida, compondo um sistema do tipo *water jacket* (Figura 7). A vazão de metano foi medida diariamente usando um sistema de gasômetro de deslocamento de líquido preenchido com solução de NaOH a 5% (m / v) (PALMA et al. 2018). O volume final foi obtido após correção para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP).



**Figura 6** - Sistema metanogênico: 1. Reservatório do afluente; 2. Bomba de alimentação; 3. AnSBBR; 4. Sistema de agitação; 5. Bomba de descarga; 6. Reservatório do efluente; 7. Painel de controle para acionamento automático das bombas e do sistema de agitação; 8. Gasômetro; 9. Refrigerador.



**Figura 7** – 1. Sistema de aquecimento do reator; 2. Sistema de agitação; 3. Controle do sistema de agitação; 4. Vista do reator metanogênico e do cesto de aço inox.

A alimentação foi realizada por meio de uma bomba submersa da marca Boyu® modelo SP-700 com vazão de  $2,1 \text{ L min}^{-1}$ . A descarga foi realizada por uma bomba peristáltica da marca NETZ 5CH modelo LE445A com vazão de  $0,69 \text{ L min}^{-1}$ . O enchimento do reator foi realizado em aproximadamente 2 minutos e o esvaziamento em 6 minutos. A autonomia do processo foi garantida pelo uso de temporizadores digitais, responsáveis pelo acionamento/parada das bombas e do sistema de agitação.

#### 4.3.2 Inóculo e partida do reator

A imobilização celular foi realizada em cubos de espuma de poliuretano com 1 cm de aresta (densidade de  $33 \text{ kg m}^{-3}$  e porosidade de 95%) e na rama de mandioca submetida a hidrólise ácida (conforme metodologia descrita no item 4.1), na proporção 1:1 (m/m). A imobilização mista foi uma alternativa para evitar a perda da biomassa aderida à rama, tendo em vista a degradação do material lignocelulósico ao longo do experimento, conforme reportado no item 3.2.1.1.

Como inóculo, foi utilizado lodo anaeróbio ( $58 \text{ gSSV L}^{-1}$ ) coletado em um tanque de armazenamento de dejetos em uma suinocultura localizada na região Norte do Paraná - Brasil. A imobilização celular consistiu na adição do inóculo ( $\sim 10 \text{ gVSS L}^{-1}$ ) à espuma de poliuretano e à rama hidrolisada. Para garantir a fixação da biomassa, o inóculo e o material suporte foram mantidos em um *shaker* (marca Marconi modelo MA- 420) sob agitação de 300 rpm e temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , durante 96 h.

Na partida do reator foram utilizados aproximadamente 950 g de material suporte previamente inoculado com o lodo anaeróbio. O volume do reator foi completado com 5,2 L

do efluente do reator acidogênico ( $4,0 \text{ gDQO L}^{-1}$ ) que teve o pH ajustado para 7,0 a partir da adição de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), estabelecendo relação  $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$  de 0,38. A temperatura do reator foi mantida à  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , com agitação de aproximadamente 250 rpm e tempo de ciclo de 24 h, durante 21 dias.

#### 4.3.3 Condições operacionais

O reator metanogênico foi alimentado com o efluente do reator acidogênico diluído (Tabela 9) para compor a concentração de matéria orgânica em  $5 \text{ gDQO L}^{-1}$ .

**Tabela 9** – Caracterização do efluente do reator acidogênico.

Parâmetros	Efluente acidogênico
pH	$4,3 \pm 0,8$
DQO ( $\text{g O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	$5,0 \pm 1,2$
Carboidratos ( $\text{g L}^{-1}$ )	$0,005 \pm 0,005$
Sólidos Totais ( $\text{g L}^{-1}$ )	$2,2 \pm 0,9$
Sólidos Voláteis Totais ( $\text{g L}^{-1}$ )	$1,1 \pm 0,4$
Nitrogênio total – NTK ( $\text{g L}^{-1}$ )	$0,06 \pm 0,01$
Fósforo total ( $\text{g L}^{-1}$ )	$0,01 \pm 0,001$
$\text{Fe}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$4,9 \pm 0,3$
$\text{Cu}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$0,09 \pm 0,02$
$\text{K}^+$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$521 \pm 58$
$\text{Ni}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$0,1 \pm 0,01$
$\text{Mn}^{2+}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$0,6 \pm 0,1$
Ácido acético ( $\text{mgDQO L}^{-1}$ )	$1841 \pm 209$
Ácido láctico ( $\text{mgDQO L}^{-1}$ )	$276 \pm 13$
Ácido butírico ( $\text{mgDQO L}^{-1}$ )	$269 \pm 25$
Ácido propiônico ( $\text{mgDQO L}^{-1}$ )	$229 \pm 16$
Etanol ( $\text{mgDQO L}^{-1}$ )	$1794 \pm 189$

As condições operacionais (Tabela 10) foram estabelecidas tendo em vista o aumento da carga orgânica volumétrica ( $4 - 16 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), que esteve condicionada à diminuição do tempo de ciclo ( $24 - 6 \text{ h}$ ), mantendo-se concentração afluente fixa ( $5 \text{ gDQO L}^{-1}$ ).

**Tabela 10** - Resumo das condições experimentais do AnSBBR metanogênico.

Ensaio	Tempo de ciclo (h)	Número de ciclos (Ciclos $\text{d}^{-1}$ )	COV ( $\text{gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	Tempo de operação (d)	Total de ciclos
I	24	1	4,0	42	42
II	12	2	8,0	38	76
III	8	3	12,0	34	102
IV	6	4	16,0	38	152

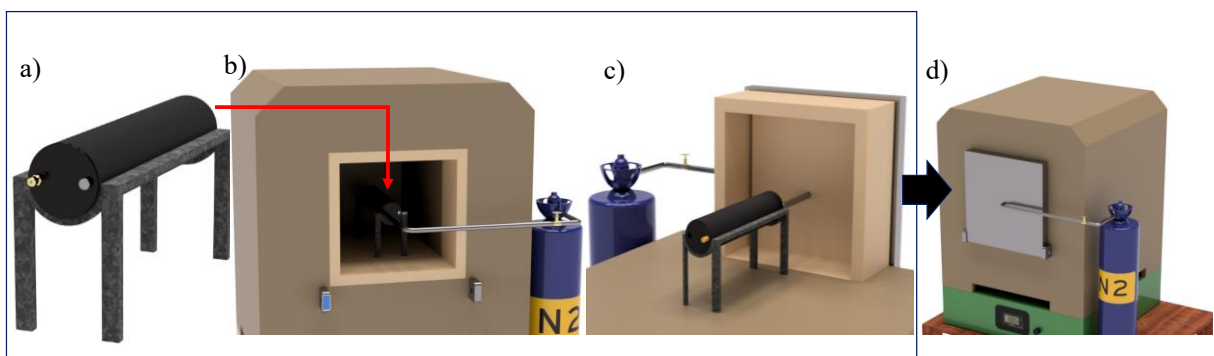
DQO – Demanda química de oxigênio; COV – carga orgânica volumétrica.

## 4.4 PRODUÇÃO DE METANO COM ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSAGENS DE BIOCARVÃO (FASE IV)

### 4.4.1 Produção do biocarvão

O biocarvão foi produzido a partir do lodo e do material de imobilização do reator acidogênico, coletados ao final da operação do reator. A temperatura de pirólise foi determinada a partir da análise termogravimétrica (TGA) da matéria-prima, realizada em um analisador TGA 400 (marca Perkin Elmer), com taxa de aquecimento de  $18^{\circ}\text{C min}^{-1}$  entre as temperaturas de 30 a  $800^{\circ}\text{C}$ , sob fluxo de gás nitrogênio de  $20\text{ cm min}^{-1}$ .

Para produção do biocarvão foram adotadas as metodologias de Boligon (2015) e Stevanato et al. (2020). Aproximadamente 200 g da matéria-prima foi seca em estufa a  $90^{\circ}\text{C}$  (*overnight*). Em seguida, o material foi introduzido em um reator cilíndrico de aço inoxidável com dimensões de 17,5 cm de comprimento e 4,5 cm de diâmetro, com duas tampas rosqueáveis em suas extremidades, cujos orifícios permitiam a entrada de  $\text{N}_2$  (para garantir atmosfera inerte) e saída dos gases produzidos (Figura 8). O reator foi inserido em mufla e conectado a um tubo de cobre ( $\frac{1}{4}''$ ) para garantir o fluxo de  $\text{N}_2$  ( $200\text{ mL min}^{-1}$ ). A pirólise foi realizada por um período de duas horas à temperatura de  $800^{\circ}\text{C}$  (rampa de aquecimento de  $18^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Após a pirólise, o material foi esfriado, pesado e caracterizado. As metodologias utilizadas na caracterização do biocarvão encontram-se descritas no item 4.6.5.



**Figura 8** - Esquema do sistema de produção do biocarvão: a) reator; b) reator alocado na parte interna da mufla conectado ao cilindro de  $\text{N}_2$ ; c) imagem interna da mufla; d) mufla fechada com reator conectado ao cilindro de  $\text{N}_2$ .

### 4.4.2 Ensaios para avaliar a produção de metano com adição de biocarvão

#### 4.4.2.1 Substrato, inóculo e imobilização celular

O efluente do reator acidogênico ( $5\text{ gDQO L}^{-1}$ ) foi utilizado como substrato (composição no item 4.3.3). Como inóculo, foi usado lodo de suinocultura ( $58\text{ gSSV L}^{-1}$ ), cuja imobilização celular foi realizada na rama de mandioca hidrolisada (item 4.1) e espuma de

poliuretano (densidade de 33 kg m<sup>3</sup> e porosidade de 95%), conforme metodologia descrita no item 4.3.2.

#### 4.4.2.2 Testes em batelada

Nestes ensaios foram utilizadas diferentes dosagens de biocarvão, totalizando 7 ensaios compostos por: T1 (0,5 g L<sup>-1</sup>); T2 (1,0 g L<sup>-1</sup>); T3 (1,5 g L<sup>-1</sup>); T4 (2,0 g L<sup>-1</sup>); T5 (3,0 g L<sup>-1</sup>), T6 (6,0 g L<sup>-1</sup>) e o controle (C), sem adição de biocarvão. Os ensaios foram conduzidos em batelada, utilizando frascos de 2 L, com adição de aproximadamente 60 g da biomassa imobilizada e 800 mL da ARFM acidificada (pH ajustado para 7,0 com NaHCO<sub>3</sub>), sendo mantido aproximadamente 1,0 L de *headspace*. Os frascos foram fluxionados com nitrogênio (N<sub>2</sub>), lacrados com septo de borracha e incubados à temperatura de 35°C sob agitação constante (200 rpm). O volume de gás gerado foi medido diariamente por meio de deslocamento líquido, conforme descrito no item 4.3.1, e o volume final do gás foi obtido após correção para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Inicialmente, os ensaios foram conduzidos com tempo de ciclo de 24 h (COV 4 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) por 7 dias para aclimação da biomassa. Posteriormente, duas condições operacionais foram estabelecidas, considerando redução do tempo de ciclo e aumento da carga orgânica, conforme apresentado na Tabela 11.

**Tabela 11** - Resumo das condições experimentais dos ensaios com adição de biocarvão.

Condição	Tempo de ciclo (h)	Número de ciclos (Ciclos d <sup>-1</sup> )	COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo de operação (d)	Total de ciclos
i	12	2	8,0	14	28
ii	6	4	16,0	14	56

DQO – Demanda química de oxigênio; COV – carga orgânica volumétrica.

Foram realizadas coletas de amostras de gás ao longo do ciclo de operação de cada condição para construção dos perfis de produção de metano. As coletas foram realizadas no 4º, 8º e 12º dia de operação de cada condição. As variáveis resposta incluíram: eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO (εDQO, em%), produção volumétrica de biogás (L L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), produção volumétrica de metano (PVM, LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), e a imobilização celular, que foi verificada a partir da biomassa aderida ao material suporte (gSVT gsuporte<sup>-1</sup>).

#### 4.4.2.3 Análises estatísticas

Para determinar as diferenças significativas na produção de metano entre os ensaios T1-T6 e C foi realizada a análise de variância (ANOVA) no software Statistica<sup>®</sup>, considerando valores de  $p < 0,05$  como significativos.

### 4.5 AnSBBR METANOGÊNICO COM ADIÇÃO DE BIOCARVÃO (FASE V)

#### 4.5.1 Inóculo e partida do reator

Na Fase V, o reator e aparato experimental utilizados foram os mesmos descritos no item 4.3. Como o objetivo dos ensaios foi avaliar o efeito da adição do biocarvão no reator metanogênico, a biomassa utilizada na Fase III foi descartada e realizou-se uma nova imobilização celular. Como inóculo foi utilizado o lodo de suinocultura ( $58 \text{ gSSV L}^{-1}$ ) e como materiais de imobilização foram utilizadas as ramas de mandioca hidrolisadas de forma ácida e espumas de poliuretano, conforme metodologia descrita no item 4.3.2. Para a partida do AnSBBR, aproximadamente 950 g da biomassa imobilizada de forma mista foram colocados em contato com o biocarvão (conforme quantidade ótima definida na Fase IV) e mantido sob agitação (200 rpm) e temperatura ( $35^\circ \text{ C}$ ) contínuas por um período *overnight*. Posteriormente, esse material foi inserido no cesto de inox do reator metanogênico. O reator foi preenchido com 5,2 L do efluente acidogênico ( $5 \text{ g DQO L}^{-1}$ ) e pH ajustado para 7,0 com adição de  $\text{NaHCO}_3$ , em uma proporção  $\text{NaHCO}_3/\text{DQO}$  de 0,12. O reator foi operado com tempo de ciclo de 24h e COV de aproximadamente  $4 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , de forma semelhante ao ensaio I (Fase III), durante o período de 7 dias. A biomassa foi considerada aclimatada quando a produção diária de biogás apresentou variações inferiores a 10%.

#### 4.5.2 Condições operacionais

O AnSBBR metanogênico foi alimentado com o efluente do reator acidogênico (caracterização na Tabela 9, item 4.3.2). Para fins de comparação, as condições operacionais (Tabela 12) foram estabelecidas conforme os ensaios conduzidos sem adição de biocarvão (II, III e IV), e contemplaram a redução do tempo de ciclo (12 – 6 h) e o aumento da carga orgânica ( $8 – 16 \text{ g DQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), enquanto a concentração afluente foi mantida fixa ( $5 \text{ gDQO L}^{-1}$ ).

**Tabela 12** - Resumo das condições experimentais do AnSBBR metanogênico com adição de biocarvão.

Condição	Tempo de ciclo (h)	Número de ciclos (Ciclos d <sup>-1</sup> )	COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo de operação (d)	Total de ciclos
V	12	2	8,0	32	64
VI	8	3	12,0	32	96
VII	6	4	16,0	32	128

DQO – Demanda química de oxigênio; COV – carga orgânica volumétrica.

## 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.6.1 Fase líquida

Os parâmetros pH (4500-H B), alcalinidade total (2320 B), série de sólidos (2540 B, C, D, E, para os sólidos em suspensão foram utilizados filtros de fibra de vidro com 1,2 µm de porosidade) e demanda química de oxigênio (DQO) total e filtrada (DQO - 5220 D, utilizando filtros de fibra de vidro com 1,2 µm de porosidade) foram determinados de acordo com *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). A concentração de nitrogênio total (NTK) e fósforo total no afluente e efluente dos reatores foram determinadas de acordo com os métodos 4500 N e 4500 PC (APHA, 2012), respectivamente. A relação C/N e C/P foram calculadas a partir da DQO e das concentrações de NTK e fósforo total presentes do líquido misto de cada reator. A acidez volátil total (AV) foi determinada segundo Dilallo e Albertson (1961) e os carboidratos totais pela metodologia de Dubois et al. (1956).

Os metais magnésio, ferro, cobre, potássio, níquel e manganês (Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>) presentes na água residuária bruta e no efluente dos reatores acidogênico e metanogênico foram analisados conforme método 3111A, de espectrometria de absorção atômica (APHA, 2012).

Os ácidos orgânicos (acético, butírico, propiônico e láctico), álcoois (etanol e metanol) e carboidratos foram analisados a partir da metodologia adaptada de Abreu et al. (2019), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu®), equipada com bomba (LC-10AD), detector de índice de refração (LC-10AD) UV com arranjo de diodos SPD-20A em comprimento de onda de 208 nm; e coluna Aminex HPX -87H (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad®), cuja temperatura foi de 60 °C. A fase móvel consistiu em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 N) com vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Os metabólitos solúveis foram posteriormente convertidos em função da matéria orgânica em termos de DQO (mgDQO L<sup>-1</sup>).

#### 4.6.2 Fase gasosa

##### a) AnSBBR Acidogênico

A composição do biogás ( $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ) foi determinada de acordo com a metodologia de Penteado et al. (2013) em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010) equipado com uma coluna capilar Carboxen® 1010 plot (30 m x 0,53 mm x 30  $\mu$ m) e detector de condutividade térmica (TCD). Como gás de arraste foi utilizado o gás Argônio com vazão de 8 mL  $min^{-1}$ . As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 200 °C e 230 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 130 °C, com taxa de aquecimento de 42 °C  $min^{-1}$  até 135 °C por 6 min. A composição do gás foi determinada duas vezes em cada ensaio. Ao longo do experimento, a composição do biogás também foi monitorada a partir da utilização de um detector de gás portátil da marca Dräger X-am® 2500 (capacidade de medição de 0 – 500 ppm).

##### b) AnSBBR Metanogênico

A composição do biogás ( $CH_4$ ,  $CO_2$ ,  $H_2S$ ) foi determinada a partir da metodologia adaptada de Abreu et al. (2019). Para tal, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010) equipado com coluna capilar SP® 2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu$ m) e detector de ionização de chama (FID). Como gás de arraste foi utilizado gás hidrogênio a uma vazão de 1,2 mL  $min^{-1}$ . As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 °C e 350 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C por 2 minutos, sendo então aquecida a uma taxa de 30 °C  $min^{-1}$  até 200 °C por 8 min, com relação de divisão (*split ratio*) de 1:5. A composição do biogás do reator metanogênico também foi monitorada por meio de um detector de gás portátil da marca Dräger X-am® 2500.

#### 4.6.3 Caracterização da rama de mandioca e biofilme

##### a) Composição da rama de mandioca

A concentração de nitrogênio, fósforo e proteína foram quantificados de acordo com a metodologia de nitrogênio para amostras brutas conforme Mizubuti et al. (2009). Os teores de lignina, celulose e hemicelulose da rama de mandioca, seguiram a metodologia da fibra, conforme Mizubuti et al. (2009), determinando-se os teores de fibra bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e lignina.

A identificação dos grupos funcionais da rama da mandioca foi realizada no Laboratório de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em um espectrofotômetro Infravermelho por transformada de Fourier, marca Shimadzu modelo IR PRESTIGE-21. As

leituras foram conduzidas em transmitância, sistema com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  com 500 scans. As medidas de Difração de Raios X (DRX) foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios X do Laboratório Multiusuário da Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da UEL, em um difratômetro da marca PANalytical modelo X'Pert PRO MPD, com radiação  $\text{CuK}\alpha$ , na técnica conhecida como  $\theta$ - $2\theta$ . A tensão e a corrente usadas foram, respectivamente, 40 KV e 30 mA. O intervalo de varredura  $2\theta$  utilizado foi de 5 a  $80^\circ$  com passo angular de  $0,04^\circ$ . O tempo de contagem por ponto foi de 6,0 s.

#### b) Biofilme

A concentração dos polissacarídeos totais (PLT) e proteínas totais (PT) foi determinada conforme metodologia adaptada de Cammatora (1998), após a lise completa das células aderidas ao material suporte. Para a extração dos compostos analisados, foi adicionado uma fração de aproximadamente  $0,5\text{ cm}^3$  do material suporte em um tubo Falcon contendo 10 mL de solução de NaOH (1 M). O recipiente foi colocado em banho-maria a aproximadamente  $100^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. Após este período, o material suporte foi retirado e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, sendo posteriormente filtrada em membrana éster celulose ( $0,22\ \mu\text{m}$ ). Após as extrações, a concentração de PLT foi determinada, utilizando o método colorimétrico de Dubois et al. (1956), utilizando glicose como padrão para construção da curva de calibração, enquanto para determinação da concentração de PT foi empregado o método de Bradford (1976), que utiliza albumina de ovo como padrão para construção da curva de calibração.

#### 4.6.4 Análises microbiológicas

Para o isolamento e contagem das bactérias produtoras do ácido láctico (LAB – *Lactic Acid Bacteria*), foram utilizados os meios de cultura ágar Man-Rogosa-Shape (MRS) e M17, com incubação das placas a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h em condições anaeróbias. Após esse período, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), sendo realizados também testes para identificação das características morfotintoriais das colônias (coloração de Gram). A contagem foi expressa em UFC por mililitro de amostra ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ), conforme Rosa et al. (2016).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada nas amostras de rama de mandioca *in natura*, NH, AH, VH e ao final da operação de cada ensaio dos reatores acidogênico e metanogênico. As amostras foram preparadas por meio de fixação, desidratação e secagem. Na realização da análise, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da

marca Philips, modelo Quanta 200 em 10 a 20 keV, as imagens foram fotografadas com um vídeo processador (Mitsubishi), com chapa fotográfica (Fuji) CK 100-S.

A análise metagênômica foi realizada para as amostras de biomassa coletadas: i) ao final do ensaio II do reator acidogênico; ii) ao final da operação dos ensaios Controle e T4 na Fase IV; e iii) ao final do ensaio IV e VII do reator metanogênico (Fases III e V). As amostras foram preparadas por meio de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos e, posteriormente, lavadas duas vezes com solução salina tampão fosfato. Para a extração de DNA, foi utilizado o kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO, USA), baseando-se nas informações do fabricante. A plataforma Illumina (Illumina Miseq PE250, Sangon Biotech, Xangai, China) foi empregada para análise de sequenciamento de alto rendimento da comunidade bacteriana. Os primers universais 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') foram utilizados para amplificar as regiões V4 do gene 16S rRNA via cadeia de polimerase (PCR – referente ao termo em inglês *Polymerase Chain Reaction*) PCR. Para as arqueas metanogênicas a região V3 foi amplificada, utilizando os primers Arc 0349 (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG) e Arc 0519 (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG).

A solução para reação em PCR foi composta de 0,5 µL de DNA polimerase Phusion (Thermo Scientific), 10 µL de tampão 5x HF (Mg<sup>2+</sup>), 1 µL de dNTP (10mM), 50 ng de molde de DNA, 1 µL de cada primer (10 pmol) e água até completar um volume de 50 µL. Posteriormente, as amostras foram inseridas em um termociclador, realizando-se a primeira desnaturação (98°C por 2 min); seguida de 25 ciclos das seguintes etapas: segunda desnaturação (98°C por 30 s); hibridação (55°C por 40 s); extensão (72°C por 2 min); alongação (72°C por 10 min). Para determinar a qualidade da amplificação, os produtos da PCR foram purificados com esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Backman Coulter, EUA), examinados por eletroforese em gel de agarose e finalmente quantificados por um kit de detecção de DNA Qubit 2.0 (Sangon Biotech, Xangai, China). Os dados foram analisados conforme metodologia de Callahan et al. (2016), utilizando-se o algoritmo DADA2 e, posteriormente, as taxonomias foram atribuídas a cada variante de sequenciamento. Para análise e construção dos gráficos foram utilizados os softwares Phyloseq® e R®.

#### 4.6.5 Caracterização do biocarvão

O biocarvão, obtido por meio da pirólise da biomassa imobilizada do reator acidogênico, foi caracterizado conforme os parâmetros descritos a seguir.

### a) Rendimento

O rendimento do biocarvão produzido foi estimado considerando os valores de massa inicial ( $m_0$ ) e final ( $m_1$ ), conforme a equação 07:

$$\text{Rendimento (\%)} = \left( \frac{m_1}{m_0} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 07})$$

### b) Análise elementar

Os teores de C, H, O, N e S no biocarvão foram determinados em Analisador Elementar por combustão Flash 2000 (Thermo Scientific), operado a temperatura de 925° C. A concentração de  $K^+$  no biocarvão foi determinada por espectrometria de emissão óptica em plasma com acoplamento indutivo (ICP-OES), modelo iCap 6500 da Thermo Scientific. O poder calorífico do biocarvão foi calculado conforme a equação 08 (SHENG et al., 2005; FOONG et al., 2020).

$$\text{PC (MJ kg}^{-1}\text{)} = -1,3675 + (0,3137 * C) + (0,7009 * H) + (0,0318 * O) \quad (\text{Eq 08})$$

Em que, PC é o poder calorífico e C, H, e O são os teores de carbono, hidrogênio e oxigênio obtidos a partir da análise elementar.

### c) pH, condutividade e determinação do ponto isoelétrico

O pH e a condutividade do BC foram determinados em solução com água destilada na proporção de 1:10 (p/v) (PETROVIC et al., 2021). O ponto isoelétrico ou ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ ) refere-se ao ponto em que o pH da superfície do material adsorvente é zero (REGALBUTO e ROBLES, 2004). Foram utilizadas 11 soluções (50 mL) preparadas com solução de 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de NaCl (pureza absoluta de 99%) obtendo-se diferentes valores de pH (2-12). Em cada solução foram adicionados 0,050±0,001g de biocarvão e posteriormente as amostras foram acondicionadas em *shaker* (Marconi, MA-420) com agitação de 170 rpm e temperatura de 25 °C por um período de 24 h. Posteriormente as soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo e determinou-se o pH final das amostras. O  $\text{pH}_{\text{PCZ}}$  foi definido após a plotagem do pH final versus inicial.

### d) Isotermas de fisissorção e área específica

As isotermas de fisissorção de  $\text{N}_2$  foram determinadas no equipamento Quantachrome NovaWin versão 10.0, após aquecimento do biocarvão a 230°C por um período de 4 horas. A área específica foi determinada pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), sendo o

volume total de poros ( $V_T$ ) obtido a partir da quantidade de gás adsorvido em  $P/P_0 = 0,99$ . O volume de microporos ( $V_\mu$ ) e a área dos microporos ( $S_\mu$ ) foram determinados a partir do método-t de Halsey. O volume de mesoporos ( $V_m$ ) foi calculado a partir da diferença entre  $V_T$  e  $V_\mu$ . A distribuição de poros foi obtida pelo método de Barret-Joiner-Halenda (BJH), utilizando o ramo de dessorção. Os ensaios foram realizados no laboratório de equipamentos multiusuários do programa de pós-graduação em química da UEL.

#### e) Estruturas orgânicas

A caracterização das estruturas orgânicas foi obtida por meio da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), utilizando um espectrômetro da marca Shimadzu, modelo PRESTIGE-21, com resolução de  $2 \text{ cm}^{-1}$ , na faixa de  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ , no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da UEL.

#### f) Isotermas de adsorção

Os ensaios de adsorção do biocarvão foram realizados a fim de verificar a capacidade de adsorção de matéria orgânica em termos de DQO solúvel (DQOf). Foram realizados ensaios em bateladas sem adição de inóculo. Para isso, frascos de 50 mL foram preenchidos com a ARFM (previamente filtrada em membrana de  $0,45\mu\text{m}$ ) em concentrações crescentes de 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000  $\text{mgDQO L}^{-1}$ , conforme metodologia adaptada de Shi et al. (2020). Posteriormente, foram adicionados  $0,050\pm 0,001 \text{ g}$  de BC aos frascos com ARFM, cujo pH foi ajustado para  $6,0\pm 0,1$  com solução NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Os frascos foram submetidos a agitação e temperatura constante ( $170 \text{ rpm}$  e  $25^\circ \text{ C}$ ) por um período de 24 h. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Ao final do ensaio, a mistura foi filtrada em membrana de acetato celulose (porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$ ) para retenção do biocarvão e em seguida a concentração de matéria orgânica remanescente da ARFM em termos de DQOf foi medida (método 5220 D, APHA, 2012). A quantidade adsorvida por grama de BC foi calculada conforme a equação 09.

$$q_e = \frac{(C_0 - C_F) \cdot V}{m} \quad (\text{Eq. 09})$$

Sendo  $C_0$  = concentração de adsorvato no início do ensaio ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $C_F$  = concentração de adsorvato remanescente ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $V$  = volume da solução utilizada (L);  $m$  = massa do adsorvente (g). O ajuste dos dados foi realizado a partir das isotermas de Langmuir e Freundlich no software Origin Pro® (2019).

#### 4.6.6 Desempenho dos reatores

As variáveis resposta usadas para avaliar o desempenho dos ensaios acidogênicos incluíram: Eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO ( $\epsilon_{DQO}$ , em %), Eficiência de remoção de carboidratos ( $\epsilon_{Carb}$ , em %), produção volumétrica de biogás (PVB –  $L L^{-1}d^{-1}$ ); produção volumétrica de hidrogênio (PVH -  $LH_2 L^{-1}d^{-1}$ ) e rendimento de hidrogênio por carga aplicada (HY,  $mLH_2 g^{-1}Carb$  e  $molH_2 g^{-1}Carb$ ).

O reator metanogênico foi avaliado a partir da eficiência de remoção de matéria orgânica em termos de DQO ( $\epsilon_{DQO}$ , em %), relação acidez total e alcalinidade total (AV/AT); relação alcalinidade intermediária e alcalinidade parcial (AI/AP); percentual de metano no biogás ( $CH_4\%$ ); produção volumétrica de metano (PVM,  $LCH_4 L^{-1}d^{-1}$ ) e rendimento de metano (MY,  $LCH_4 g^{-1} DQO$ ).

A taxa de produção de energia (TPE,  $kJ L^{-1}d^{-1}$ ) foi estimada de acordo com a metodologia de Nualsri et al. (2016), multiplicando a produção volumétrica pelo teor de energia do metano ( $36 kJ L^{-1}$ ) e pelo teor de energia do hidrogênio ( $10,8 kJ L^{-1}$ ) considerando as condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

#### 4.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Os indicadores para avaliação do sistema acidogênico-metanogênico tem como base os métodos propostos por Manssouri et al. (2013) e Inoue et al. (2014).

A carga orgânica volumétrica aplicada (COV) é expressa em  $gDQO L^{-1}d^{-1}$  ou  $gCarb L^{-1}d^{-1}$ . Para reatores operados em bateladas, foi calculada conforme a Eq.10, na qual  $C_{AFL}$  é a DQO ou concentração de carboidratos no afluente;  $V_a$  é o volume de água residuária (reator acidogênico) ou efluente acidificado (reator metanogênico) alimentado por ciclo;  $N$  o número de ciclos por dia e  $V_r$  o volume total de água residuária ou efluente acidificado contido no reator, conforme a Eq. 10.

$$COV = \left( \frac{(V_a \cdot N) \cdot C_{AFL}}{V_r} \right) \quad (\text{Eq. 10})$$

A carga orgânica volumétrica removida ( $COV_R$ ) é expressa em  $gDQO L^{-1}d^{-1}$  ou  $gCarb L^{-1}d^{-1}$ . Para reatores operados em bateladas foi calculada conforme a Eq. 11, sendo  $C_{AFL}$  a DQO ou concentração de carboidratos em amostras filtradas do afluente e  $C_{EFL}$  a DQO ou a concentração de carboidratos em amostras filtradas no efluente.

$$COVR = \left( \frac{(V_a \cdot N) \cdot (C_{AFL} - C_{EFL})}{V_r} \right) \quad (\text{Eq. 11})$$

A carga orgânica específica aplicada ( $COE_A$ ) é a quantidade de matéria orgânica, na forma de DQO ou a concentração de carboidratos, aplicada ao reator em função do tempo e da massa de sólidos totais voláteis ( $M_{SVT}$ ) no reator, expressa em gDQO gSVT<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> ou gCarb gSVT<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Para reatores operados em bateladas foi calculada conforme a Eq. 12.

$$COEA = \left( \frac{(V_a \cdot N) \cdot C_{AFL}}{M_{SVT}} \right) \quad (\text{Eq. 12})$$

A carga orgânica específica removida ( $COE_R$ ) de amostras filtradas é expressa em gDQO gSVT<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> ou gCarb gSVT<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Para reatores operados em bateladas foi calculada conforme a Eq. 13.

$$COER = \left( \frac{(V_a \cdot N) \cdot C_{AFL} - C_{EFL}}{M_{SVT}} \right) \quad (\text{Eq. 13})$$

As eficiências de remoção de DQO ( $\epsilon_{DQO}$ ) e Carboidratos ( $\epsilon_{CT}$ ) calculadas para amostras filtradas e não filtradas são expressas em (%). Para reatores operados em bateladas foram calculadas conforme as Eq.14 e 15, nas quais  $C_{AFL}$  é a DQO ou concentração de carboidratos no afluente, e  $C_{DQOT}$  e  $C_{CT}$  referem-se à DQO e concentração de carboidratos em amostras do efluente.

$$\epsilon_{DQO} (\%) = \left( \frac{(C_{SAFL} - C_{DQOT})}{C_{SAFL}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 14})$$

$$\epsilon_{CT} (\%) = \left( \frac{(C_{CAFL} - C_{CT})}{C_{CAFL}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 15})$$

A vazão volumétrica de hidrogênio ( $Q_{H_2}$ ) representa o volume de hidrogênio produzido por dia ( $LH_2 \text{ d}^{-1}$ ) e foi calculada de acordo com a Eq. 16, na qual  $Q_{bg}$  representa a vazão de biogás e  $\%H_2$  representa a concentração de hidrogênio no gás.

$$Q_{H_2} = Q_{bg} \cdot \%H_2 \quad (\text{Eq. 16})$$

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH de H<sub>2</sub>), expressa em L H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, representa o volume de hidrogênio gerado por unidade de tempo (d) e o volume total de água residuária contida no reator (L), sendo calculada conforme a Eq. 17.

$$PVH = \left( \frac{Q_{H_2}}{V_r} \right) \quad (\text{Eq. 17})$$

O rendimento molar de hidrogênio por carga aplicado ou *hydrogen yield* (HY), expresso em mol H<sub>2</sub> kg Carb<sup>-1</sup>, é definido como a quantidade de mols de hidrogênio (H<sub>2</sub>) produzidos, em função da quantidade de matéria orgânica aplicada em termos de carboidratos (massa, em kg), calculada de acordo com a Eq. 18.

$$HY = \left( \frac{n_{H_2}}{N \cdot V_a \cdot C_{CAFL}} \right) \quad (\text{Eq. 18})$$

A Vazão molar de metano (Q<sub>mmCH<sub>4</sub></sub>) expressa em mmol CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>, representa o número de mols de metano produzido por dia e foi calculado de acordo com a Eq. 19, na qual V<sub>i</sub> representa o volume de amostra injetada no cromatógrafo (mL).

$$Q_{mm_{CH_4}} = \left( \frac{Q_{bg} \cdot n_{CH_4}}{V_i} \right) \quad (\text{Eq. 19})$$

A vazão volumétrica de metano (Q<sub>CH<sub>4</sub></sub>) representa o volume de metano produzido por dia (L CH<sub>4</sub> d<sup>-1</sup>), e foi calculada de acordo com a Eq. 20, na qual Q<sub>bg</sub> representa a vazão de biogás e %CH<sub>4</sub> representa a concentração de metano no gás.

$$Q_{CH_4} = Q_{bg} \cdot \%CH_4 \quad (\text{Eq. 20})$$

A produção volumétrica de metano (PVM), expressa em L CH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, representa o volume de metano produzido por unidade de tempo (d) em função do volume total de efluente acidificado contido no reator (L), sendo calculada conforme a Eq. 21.

$$PVM = \left( \frac{Q_{CH_4}}{V_r} \right) \quad (\text{Eq. 21})$$

O rendimento de metano por carga aplicada ou *methane yield* (MY) representa o volume de metano produzido (L) em função da matéria orgânica aplicada na forma de DQO (massa, em g), expresso em L CH<sub>4</sub> g DQO<sup>-1</sup> e calculado de acordo com a Eq. 22.

$$MY = \left( \frac{Q_{CH_4}}{N \cdot V_a \cdot C_{AFL}} \right) \quad (\text{Eq. 22})$$

O rendimento de metano por matéria orgânica removida (MY<sub>r</sub>) na forma de DQO é definido como o volume de metano produzido pela massa de matéria orgânica removida (LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>), conforme equação abaixo:

$$MYr = \left( \frac{Q_{CH_4}}{N \cdot V_a \cdot (C_{AFL} - C_{EFL})} \right) \quad (\text{Eq. 23})$$

#### 4.7.1 Quantificação da biomassa do sistema acidogênico e metanogênico

A quantificação da biomassa imobilizada foi realizada após o término de cada condição experimental, conforme a metodologia de Manssouri et al. (2013) e Inoue (2013). Quantificou-se o volume de meio reacional (V<sub>R</sub>), a biomassa suspensa presente na massa líquida (SSV), a mistura suporte inerte mais biomassa (MT-SI+B) e a biomassa aderida ao suporte (MA-SI+B).

Após a completa mistura do suporte inerte mais biomassa (MT-SI+B), foi coletada uma alíquota para determinação da quantidade de biomassa aderida ao suporte (MA-SI+B). A amostra foi lavada com água destilada para remover completamente o material aderido ao suporte (rama e espuma de poliuretano) e, a partir das frações obtidas, foram determinados os sólidos totais (ST) da fase sólida, composta pelo material suporte (MA-SI); e os sólidos totais (ST) e sólidos voláteis totais (SVT) da fase líquida, na qual está contida a biomassa (M<sub>A-SVT</sub>).

A quantidade de biomassa presente no reator foi estimada considerando-se:

- a) A quantidade total de biomassa no reator (M<sub>SVT</sub>), conforme Eq.24:

$$M_{SVT} = \left( \frac{M_{A-SVT} \cdot M_{T-SI+B}}{M_{A-SI+B}} \right) \quad (\text{Eq. 24})$$

- b) A relação entre a quantidade de biomassa e o volume de meio líquido do reator (C<sub>x</sub>), calculada conforme a Eq. 25.

$$C_x = \left( \frac{M_{STV}}{V_R} \right) \quad (\text{Eq. 25})$$

- c) A relação entre a quantidade de biomassa e a quantidade de suporte inerte presente no reator (C<sub>x'</sub>), conforme a Eq. 26.

$$C_{x'} = \left( \frac{M_{A-SIV}}{M_{A-SI}} \right) \quad (\text{Eq. 26})$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FASE I – AVALIAÇÃO DA RAMA DE MANDIOCA COMO MEIO PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR

#### 5.1.1 Hidrólise da Rama da Mandioca

Amostras de CS foram submetidas à hidrólise ácida e a vapor com a finalidade de converter sua estrutura lignocelulósica em celulose e, dessa forma, aumentar a porosidade do material para posterior imobilização celular, além de favorecer a degradação desse material pelos microrganismos. A composição da CS antes e após os tratamentos, é apresentada na Tabela 13.

**Tabela 13** - Caracterização da composição lignocelulósica da rama da mandioca antes e após os tratamentos.

Amostra	Lignina %	Celulose %	Hemicelulose %	Concentração de glicose (g L <sup>-1</sup> )
NH	28 ± 2	35 ± 2	21 ± 5	0,05 ± 0,03
AH	14 ± 0,4	62 ± 2	15 ± 0,8	3,2 ± 0,6
VH	20 ± 0,6	46 ± 5	19 ± 0,6	1,8 ± 0,9

NH – Nenhuma hidrólise; AH – hidrólise ácida; VH – hidrólise no vapor.

Observa-se que os tratamentos aplicados foram eficazes na conversão da lignina em celulose. Após a AH, houve redução nos teores de lignina de 28% para 14% e aumento do teor de celulose de 35% para 62%, representando redução de até 50% na estrutura cristalina e recalcitrante da parede da célula vegetal. Tais resultados são semelhantes aos verificados por Kamalini et al. (2018), que obtiveram 45% de redução nos teores de lignina da CS ao empregar a hidrólise alcalina estimulada por micro-ondas. O tratamento VH foi menos eficiente que a AH, apresentando 29% de redução da lignina. De acordo com Ramprakash e Muthukumar (2015), os métodos de hidrólise física, são menos eficientes que os químicos, que possuem maior capacidade de conversão da estrutura lignocelulósica.

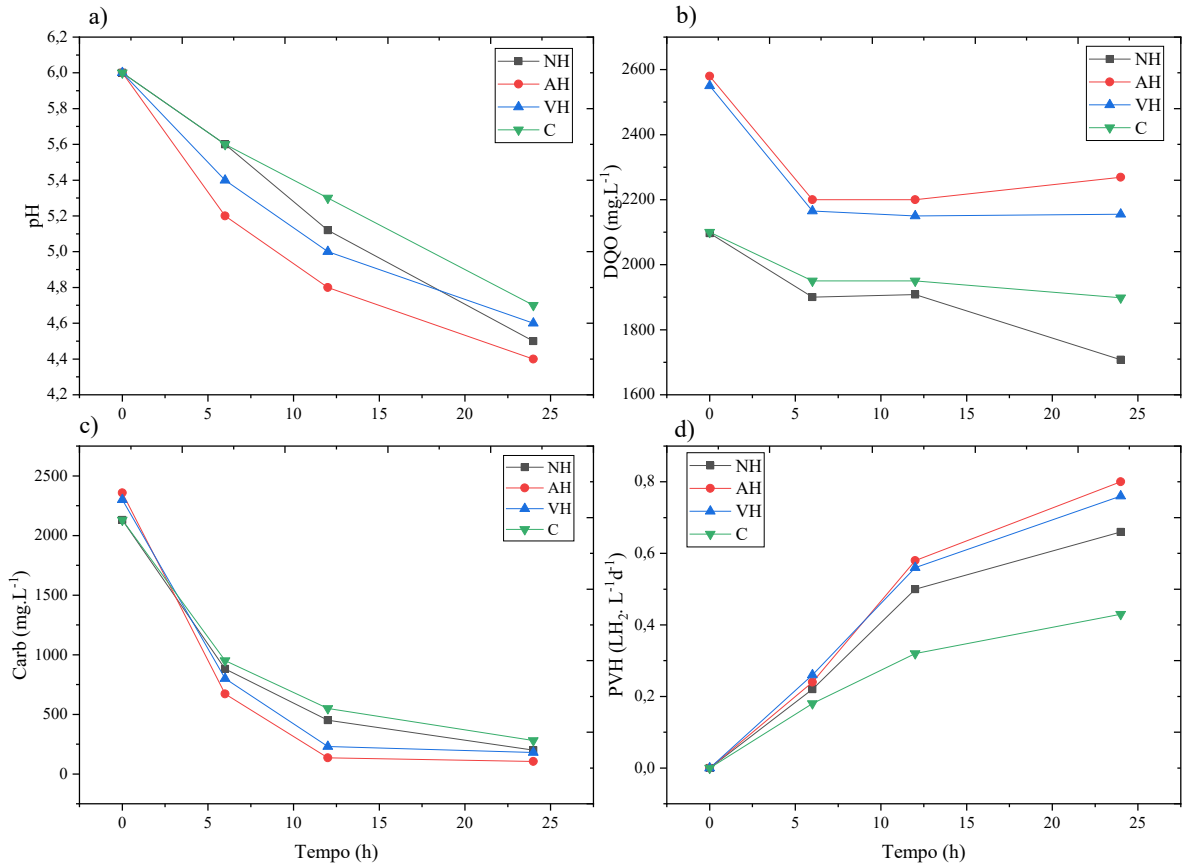
As moléculas de celulose têm orientações diferentes em toda sua estrutura, levando a diferentes níveis de cristalinidade, que consistem em regiões de baixa e de alta cristalinidade (PAULY e KEEGSTR, 2008, REN et al. 2016). Assim, quanto maior o índice de cristalinidade, mais difícil se torna a biodegradação da celulose (KLINPRATOON et al. 2015; NAGARAJAN et al. 2019). A hidrólise das ramas promove o rearranjo das estruturas cristalinas, causando alteração na composição lignocelulósica, o que pode favorecer a fermentação.

A AH demonstrou ser o tratamento mais eficiente na conversão da estrutura lignocelulósica em celulose e glicose, dessa forma, o ácido cítrico pode ser uma alternativa promissora, devido ao menor custo e toxicidade quando comparado aos ácidos inorgânicos (ZHENG et al., 2014; NAGARAJAN et al., 2019). Para que o processo seja viável, o pré-tratamento da biomassa deve apresentar baixo custo operacional, eficácia em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica e resultar na recuperação da maioria dos componentes lignocelulósicos (GOKFILIZ e KARAPINAR, 2017).

### 5.1.2 Ensaio preliminares: impacto da imobilização celular sobre a produção fermentativa de hidrogênio

#### 5.1.2.1 Produção de hidrogênio

A Figura 9 apresenta a variação em relação ao pH, consumo de carboidratos e DQO, e desempenho da PVH ao longo da fermentação. O pH do efluente variou de 4,4 a 4,7 e a remoção média de DQO foi de 10% a 20% nos ensaios com biomassa imobilizada. A eficiência de remoção, em termos de DQO, é baixa, pois a matéria orgânica é convertida em produtos como ácidos orgânicos e álcoois, que permanecem no sistema (TORRES et al. 2017; CORBARI et al. 2019). A eficiência média no consumo de carboidratos foi de 96%, 91%, 87% e 82% para os ensaios AH, VH, NH e Controle, respectivamente. Nota-se na Figura 9 (c) que a concentração inicial de carboidratos totais foi maior no AH e VH, devido à adição das ramas de mandioca hidrolisadas. Nos ensaios AH e VH foram identificadas concentrações iniciais de sacarose (1,87 e 1,79 g L<sup>-1</sup>); frutose (1,02 e 0,88 g L<sup>-1</sup>) e maltose (0,44 e 0,21 g L<sup>-1</sup>), respectivamente. No NH foram detectados 1,82 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,78 g L<sup>-1</sup> de frutose, enquanto no C foi detectado apenas 1,82 g L<sup>-1</sup> de sacarose, correspondendo a fração do próprio substrato (AS). Nos ensaios AH, VH, NH e C foram verificadas taxas de consumo de açúcares, de 0,44 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>; 0,41 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>; 0,35 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 0,31 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando que o consumo de carboidratos foi mais rápido nos ensaios com adição das ramas.



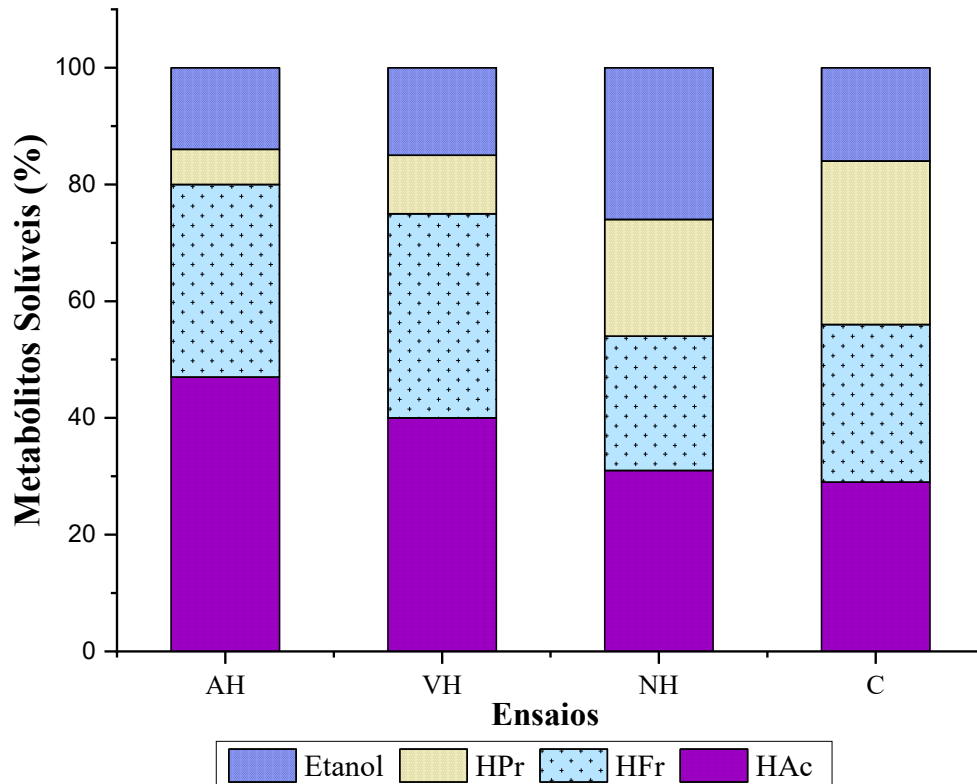
**Figura 9** - Perfis de a) pH; b) consumo de DCO; c) consumo de carboidratos; e d) PVH nos ensaios NH – Nenhuma hidrólise; AH – hidrólise ácida; VH – hidrólise no vapor e C – Controle.

As maiores produções de 0,79 e 0,75 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e rendimento de 388 e 370 mLH<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>Carb ocorreram nos ensaios AH e VH, respectivamente, enquanto no ensaio NH foram verificados as menores PVH de 0,66 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e HY de 332 mLH<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>Carb. A maior produção de hidrogênio foi associada a imobilização celular, uma vez que o ensaio controle (C) apresentou HY e PVH de apenas 244 mLH<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>Carb e 0,48 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, representando 40% a menos de hidrogênio que o ensaio AH. Verificou-se, portanto, que a adição da rama de mandioca hidrolisada possibilitou a dispersão de carboidratos fermentáveis contribuindo para o aumento da transferência de massa entre substratos e microrganismos, o que colaborou para a maior produção de hidrogênio.

### 5.1.2.2 Metabólitos solúveis

Em relação aos subprodutos da fermentação, em todos os ensaios foram identificados os ácidos acético, fórmico, propiônico, além do etanol (Figura 10). Houve predominância do ácido acético em todos os ensaios, com maiores concentrações nos ensaios AH (0,94 gDQO L<sup>-1</sup>) e VH (0,40 gDQO L<sup>-1</sup>), representando 46% e 35% dos metabólitos quantificados,

respectivamente. Nos ensaios NH e C as concentrações de ácido acético foram inferiores ( $0,24$  e  $0,20$  gDQO L<sup>-1</sup>), representando 31% e 29%, respectivamente.



**Figura 10** - Proporção de metabólitos solúveis nos ensaios AH, VH, NH e Controle.

De acordo com Sreethawong et al. (2010), a produção de ácido acético resulta em 4 mol de H<sub>2</sub> por mol de glicose (Eq. 01, item 3.1). Nesse caso, as maiores concentrações de ácido acético dos ensaios AH e VH podem justificar a maior produção de hidrogênio observada nesses ensaios ( $0,79$  e  $0,75$  LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente).

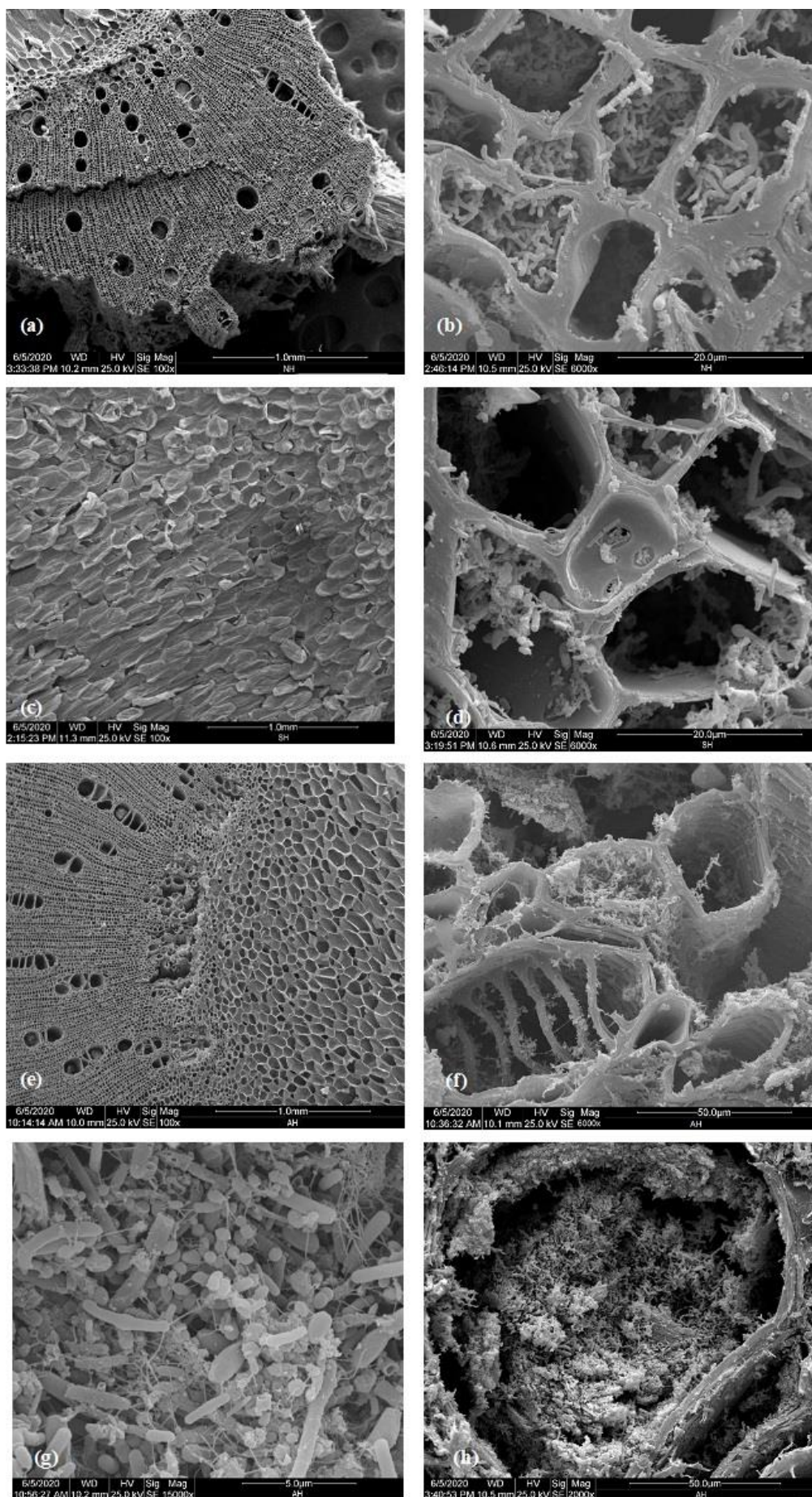
O ácido propiônico esteve presente em todos os ensaios, com maiores concentrações nos ensaios NH ( $0,16$  gDQO L<sup>-1</sup>) e C ( $0,09$  gDQO L<sup>-1</sup>), o equivalente a 20% e 28% dos metabólitos quantificados, respectivamente. A produção de ácido propiônico pode estar associada ao consumo de hidrogênio (Eq.03, item 3.1) (SREETHAWONG et al. 2010). Além disso, o aumento das pressões parciais de hidrogênio no reator e alterações nas vias metabólicas dos microrganismos são fatores que podem levar à presença do ácido propiônico (FERRAZ-JÚNIOR et al., 2016, CORBARI et al., 2019).

A presença do etanol foi verificada em todos os ensaios em proporções que variaram de 12% a 25% (Figura 10). Produtos como etanol (Eq.05, item 3.1) indicam que o hidrogênio não foi gerado nem consumido (XIA et al., 2015). No entanto, a formação concomitante de etanol e de ácido acético pode estar relacionada a via acetato-etanol, com rendimento teórico de 2 mol de hidrogênio por mol de glicose (HWANG et al., 2004). A rota do acetato-etanol pode ocorrer

a partir da fermentação de substratos ricos em carboidratos, na qual o acetato pode ser obtido do piruvato por meio da via do acetil-CoA, como também a partir da oxidação sintrófica do etanol ou de ácidos orgânicos de cadeia longa, como propionato e butirato (MÜLLER et al., 2010; ZHOU et al., 2018). Na via do acetato-etanol o equilíbrio entre NADH e NAD<sup>+</sup> é mantido, tornando o etanol neutro, o que contribui para a estabilidade na produção de hidrogênio (REN et al., 1997). Além disso, também foi observado ácido fórmico em todos os ensaios em proporções entre 24 – 36%. O ácido fórmico pode estar relacionado ao 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), que é um produto da degradação de açúcar (hexose), encontrado na hemicelulose da biomassa lignocelulósica (BHATIA et al. 2021) e pode ser convertido em ácido fórmico e levulínico. Esse subproduto também pode estar relacionado ao metabolismo de enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.* (POLADYAN et al., 2018; YANG e WANG, 2019).

### 5.1.3 Imobilização Celular

A hidrólise de materiais lignocelulósicos, aumenta a porosidade do material, devido às alterações da estrutura lignocelulósica, favorecendo a fixação dos microrganismos (KUMAR et al., 2016; SOARES et al., 2020). Na Figura 11 é possível observar que a estrutura celular da rama de mandioca se assemelha a um favo de mel de abelhas, facilitando a adesão e distribuição espacial homogênea dos microrganismos em todas as amostras (NH, VH e AH). As imagens de microscopia eletrônica possibilitaram identificar estruturas semelhantes ao *Clostridium sp.*, como bacilos curvos (LIU et al., 2020), em todos os ensaios com imobilização celular. Ao analisar a Figura 11 (e), observa-se que a hidrólise ácida aumentou os poros na parede celular da rama sendo possível identificar microrganismos atravessando os poros existentes na estrutura (Figura 11 g e h). Nas amostras NH, VH e AH foram verificadas relações biomassa/meio suporte de 0,010; 0,014 e 0,030 g<sup>-1</sup>SVT g<sup>-1</sup>suporte, respectivamente, constatando-se que nas amostras submetidas à hidrólise ácida o rearranjo da estrutura da parede celular favoreceu a fixação de até três vezes mais microrganismos que as demais amostras. O biofilme possui uma estrutura tridimensional complexa, criando um ambiente protegido para as células bacterianas (ZRELLI et al., 2013) e, como consequência, essas células apresentam maior tolerância a condições adversas e ambientes hostis (LIU et al., 2020).



**Figura 11** - MEV da CS e do biofilme: a) NH; b) biofilme em NH; c) VH; d) biofilme em VH; e) AH; f) biofilme em AH; g) morfologia do biofilme em AH; h) microrganismos aderidos às paredes internas e externas de AH.

#### 5.1.4 Considerações finais da Fase I

A hidrólise ácida possibilitou a redução de até 50% da estrutura lignocelulósica da CS. A partir da alteração da cristalinidade desse material devido à hidrólise, os carboidratos tornaram-se disponíveis aos microrganismos, aumentando em média 100 mgCarb L<sup>-1</sup> no substrato. Além do incremento no teor de carboidratos, a hidrólise aumentou a porosidade da rama, possibilitando maior adesão dos microrganismos à estrutura. Dessa forma, o aumento da disponibilidade de carboidratos aliado à adesão dos microrganismos ao material, possibilitou a produção de 0,79 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> no ensaio AH. A partir dos resultados utilizando a rama como um meio suporte alternativo e biodegradável, verificou-se a necessidade de avaliar a resistência e as implicações desse material durante os processos fermentativos. Considerando os resultados dos ensaios preliminares, a etapa seguinte desse estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de um reator anaeróbio acidogênico no qual a imobilização celular foi realizada na CS submetida a hidrólise ácida.

### 5.2 FASE II - REATOR ACIDOGÊNICO

#### 5.2.1 Desempenho do reator acidogênico

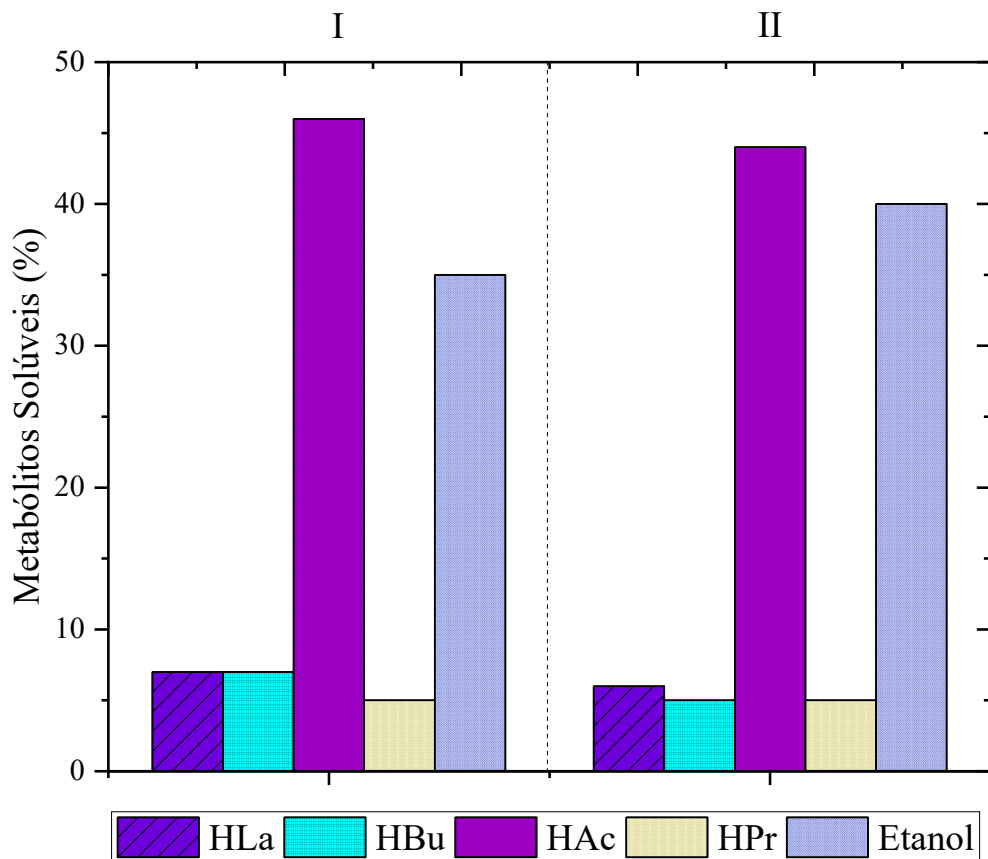
O uso da rama de mandioca como material suporte foi analisado em relação ao seu desempenho para a adesão dos microrganismos e como cosubstrato na fermentação da ARFM. Para tal, foram conduzidos dois ensaios com COV de 11 e 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> atrelados à diminuição do tempo de ciclo (de 4 para 3 h), enquanto a concentração afluyente foi mantida fixa (5 gCarb L<sup>-1</sup>). Os indicadores de desempenho do reator são apresentados na Tabela 14. A eficiência média de conversão de carboidratos totais foi de 98% e 97%, nos ensaios I e II, indicando que o tempo de ciclo do reator de 4 h e 3 h foi suficiente para promover a degradação de carboidratos presentes no substrato. Em relação à remoção de DQO, a eficiência foi baixa (aproximadamente 10%) em ambas as condições, o que é comum em reatores acidogênicos, uma vez que a matéria orgânica é convertida em produtos intermediários, que permanecem no reator.

**Tabela 14-** Parâmetros de estabilidade operacional e eficiência do AnSBBR acidogênico.

Ensaio	COV (gCarb L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	pH	Metabólitos solúveis totais (mgDQO L <sup>-1</sup> )	εDQO (%)	εCarb (%)	SVT (mg L <sup>-1</sup> )	SST (mg L <sup>-1</sup> )	SSV (mg L <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> (%)	PVH (LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	HY (molH <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> Carb)
I	11	4,5±0,6	4220±182	10±5	98±0,2	1002±75	201±32	191±17	31±7	0,98±0,07	1,42 ±0,22
		<b>4,78</b>	<b>4489</b>	<b>15</b>	<b>99</b>	<b>1094</b>	<b>244</b>	<b>211</b>	<b>39</b>	<b>1,03</b>	<b>1,78</b>
II	15	4,5±0,2	4619±223	8±4	97± 0,2	1182±274	303±22	289±37	35±12	1,20±0,05	1,7±0,4
		<b>4,69</b>	<b>4691</b>	<b>12</b>	<b>99</b>	<b>1404</b>	<b>341</b>	<b>313</b>	<b>43</b>	<b>1,48</b>	<b>1,98</b>

\*\*Os valores em negrito representam os valores máximos. COV: carga orgânica volumétrica; εDQO: eficiência de remoção de DQO; εCarb: eficiência de remoção de carboidratos; SVT: sólidos voláteis totais; SST: sólidos em suspensão totais; SSV: sólidos em suspensão voláteis; PVH: produção volumétrica de hidrogênio; HY: rendimento de hidrogênio.

O pH efluente permaneceu na faixa de 4,5 a 4,8 em ambos os ensaios, enquanto a concentração de metabólitos se manteve em  $4220 \pm 182$  mgDQO L<sup>-1</sup> (ensaio I) e  $4619 \pm 223$  mgDQO L<sup>-1</sup> (ensaio II). A faixa de pH influencia diretamente a ação da enzima hidrogenase e o metabolismo dos microrganismos fermentativos (HWANG et al., 2004; ELBESHBISHY et al., 2017) e, embora a faixa de pH entre 4,5 e 6,5 comumente favoreça a via do acetato-butirato (DAS e VEZIROGLU, 2008), em ambas as condições experimentais a rota acetato-etanol foi predominante (Figura 12).



**Figura 12** - Proporção de metabólitos solúveis nos ensaios I e II.

Os ácidos láctico, butírico e propiônico representaram, aproximadamente 7% ( $276 \pm 13$  mgDQO L<sup>-1</sup>), 6% ( $269 \pm 25$  mgDQO L<sup>-1</sup>) e 5% ( $229 \pm 16$  mgDQO L<sup>-1</sup>) dos metabólitos formados em ambas as COVs testadas, respectivamente. A concentração do HLa foi 80% inferior à produção do ácido acético ( $1841 \pm 209$  mgDQO L<sup>-1</sup>) e de etanol ( $1794 \pm 189$  mgDQO L<sup>-1</sup>). A conversão de carboidratos em ácido láctico é comum em reatores acidogênicos alimentados com ARFM, uma vez que as bactérias lácticas são microrganismos naturalmente presentes nas raízes de mandioca (ROSA et al., 2016) e, conseqüentemente, podem se desenvolver no reator, sendo provenientes tanto do substrato quanto do inóculo (TONELLO et al., 2018; ANDREANI et al., 2019; GARCÍA- DEPREAECT et al., 2020). No entanto, a rota metabólica do ácido láctico não

foi dominante neste estudo, no qual houve predominância do acetato e do etanol, que contribuíram para a produção de hidrogênio no reator.

Em ambos os ensaios, o ácido acético e o etanol representaram juntos mais de 80% do total dos metabólitos gerados. Rosa et al. (2016) estudaram a produção de H<sub>2</sub> a partir da ARFM em reatores anaeróbios de leito fluidizado (AFBR) com variação na COV de 4 a 30 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e constataram predominância da via metabólica do acetato-etanol. De acordo com os autores, para COV de 10 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, o HAc e etanol representaram 65% do total de metabólitos, com rendimentos de hidrogênio de até 2,0 mmol g<sup>-1</sup>DQO. Torres et al. (2017) avaliaram a produção de H<sub>2</sub> a partir da ARFM (COV 9,5 – 13,5 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) em um reator anaeróbio de leito fixo utilizando material lignocelulósico (hastes de bambu) como material suporte. Os autores verificaram predominância da rota metabólica do acetato-etanol, sendo que o etanol representou quase 50% do total de metabólitos para COV de 9,5 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, com rendimento de 0,86 mmol gDQO<sup>-1</sup>.

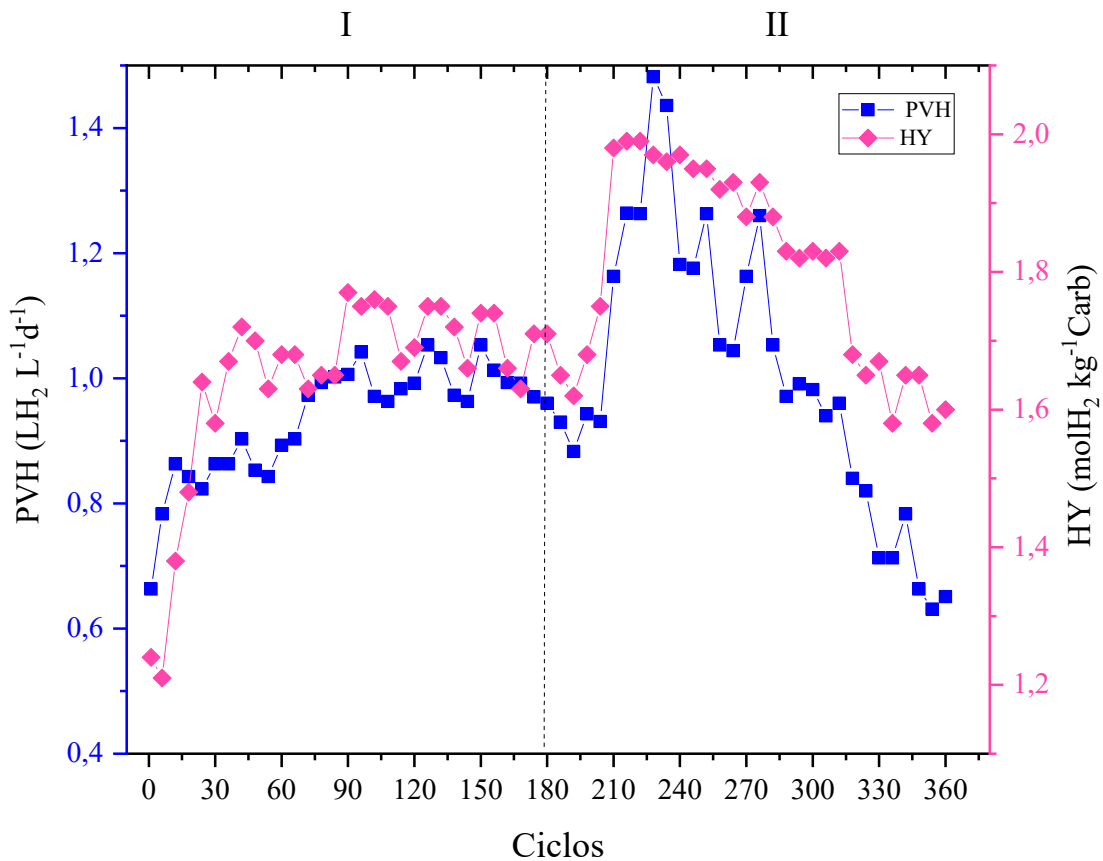
A via do acetato-etanol pode ser favorecida em reatores com biomassa imobilizada, temperatura mesofílica e alimentados com substratos com elevada concentração de açúcares (LEE et al., 2010; FERREIRA et al., 2018b). Essa via metabólica também foi predominante no pré-ensaio (Fase I, item 5.1), utilizando-se substrato a base de sacarose, temperatura de 35 °C e imobilização na CS. A produção de etanol durante a fermentação também pode estar diretamente relacionada à redução no tempo de ciclo, ocasionando alterações na comunidade microbiana, favorecendo a produção de acetato e etanol em detrimento a de butirato e propionato (ANTONOPOULOU et al., 2008; McILROY et al., 2017; PECES et al., 2021).

Ren et al., (1997), Papa et al. (2015) e Han et al. (2015) reportaram a presença do etanol como um dos principais produtos intermediários da fermentação de materiais lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar; grama e bagaço de milho, devido ao processo de conversão da estrutura celulósica em diversos tipos de carboidratos fermentáveis (como glicose, sacarose, xiloses, pentoses, hexoses, entre outros), aliada à composição polímero aromática da lignina, que quando exposta à fermentação por culturas microbianas mistas, em temperatura mesofílica e termofílica, podem produzir simultaneamente ácido acético, acetilacetona, butanol, etanol e hidrogênio (CANILHA et al., 2012, BHATIA et al., 2021).

### 5.2.2 Desempenho do reator acidogênico em relação à produção de hidrogênio

Em média, a concentração de hidrogênio no biogás representou 31±7% (ensaio I) e 35±12 % (ensaio II), alcançando teores máximos de 43% no ensaio II. Não foi verificada a

presença de metano no biogás, sugerindo que o tratamento térmico do inóculo e as condições operacionais foram efetivas no controle dos microrganismos consumidores de hidrogênio. O rendimento médio de hidrogênio por carga aplicada foi de  $1,42 \pm 0,22 \text{ molH}_2 \text{ kg}^{-1}\text{Carb}$  e  $1,78 \pm 0,4 \text{ molH}_2 \text{ kg}^{-1}\text{Carb}$ , nos ensaios I e II respectivamente, enquanto a produção volumétrica média de hidrogênio nos ensaios I e II foi de  $0,98 \pm 0,17 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $1,2 \pm 0,22 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , com produção máxima de hidrogênio de  $1,48 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  no ensaio II (Figura 13).



**Figura 13** - Produção volumétrica (PVH) e rendimento (HY) de hidrogênio ao longo do ensaio I (11 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 4h) e ensaio II (15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 3h).

O aumento da COV de 11 para 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e a redução do tempo de ciclo de 4 para 3 h, proporcionaram aumento da produção volumétrica de 0,98 para 1,2 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Não houve inibição na produção de hidrogênio ao longo dos ensaios, embora tenha ocorrido decréscimo na produção para  $0,67 \pm 0,08 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  nos últimos 36 ciclos do ensaio II, conforme será discutido no item 5.2.3. Na literatura foram reportadas instabilidades na operação de reatores acidogênicos alimentados com ARFM decorrentes do aumento da COV e da redução no tempo de ciclo. Sreethawong et al. (2010) e Intanoo et al. (2016) verificaram instabilidades associadas ao aumento da COV para valores acima de 30 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, ocasionando diminuição da produção e rendimento de hidrogênio devido à inibição causada pelo acúmulo de ácidos

orgânicos voláteis. Tonello et al. (2018) observaram acúmulo de AOV em um AnSBBR alimentado com ARFM, ao reduzir o tempo de ciclo de 4 h para 2 h, resultando na redução da produção volumétrica de hidrogênio de 35,7 para 9,18 molH<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>.

De acordo com Park et al. (2019) e Castelló et al. (2019) limitações ocasionadas por alterações na COV e TDH podem alterar a comunidade microbiana, causando substituição das bactérias produtoras de H<sub>2</sub> por microrganismos não-produtores e, conseqüentemente, reduzindo os teores de hidrogênio no gás. Park et al. (2019) verificaram redução em 62% da proporção de microrganismos do gênero *Clostridium* no reator, devido à diminuição do TDH de 12 h para 2,5 h. Andreani et al. (2019), analisaram a fermentação da ARFM em um AnSBBR e verificaram redução na produção de hidrogênio de 2,4 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para 0,45 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> com o aumento da COV de 14 para 18 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e redução do tempo de ciclo de 4 h para 2 h, possivelmente associadas ao acúmulo de AOV e proliferação de LAB no reator. Corbari et al. (2019) verificaram aumento na produção e rendimento de hidrogênio de 229 mLH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 0,2 molH<sub>2</sub> molCarb<sup>-1</sup> para 467 mLH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 0,3 molH<sub>2</sub> molCarb<sup>-1</sup>, respectivamente, ao aumentar a COV de 10 para 20 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, com a redução do tempo de ciclo de 4 h para 2 h em um UAFBR. Apesar do aumento da produção de hidrogênio, Corbari et al. (2019) reportaram instabilidades após 10 dias de operação do reator com a COV de 20 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, possivelmente associados ao crescimento excessivo da biomassa no reator.

No presente estudo, notou-se o aumento na produção de hidrogênio ao longo da primeira fase e nos 100 primeiros ciclos da segunda fase, o que possivelmente se deve a três fatores: i) pouca variação na composição da água residuária bruta, que proporcionou adaptação dos microrganismos ao substrato ao longo do tempo, mesmo com a redução do tempo de ciclo; ii) baixa contagem de LAB no efluente bruto e inóculo; iii) aumento da disponibilidade de micro e macronutrientes devido à adição das ramas de mandioca hidrolisadas. A partir da Tabela 15, verifica-se que a produção e rendimento de hidrogênio obtidos nesse estudo foram semelhantes aos obtidos em outros estudos que utilizaram ARFM como substrato.

**Tabela 15** - Comparativo da produção de hidrogênio entre estudos que utilizaram a ARFM como substrato.

Reator	COV (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TDH (h)	C/N	pH	Principais resultados			Referência
					ε Carb (%)	PVH*	HY	
UAFBR	35 <sup>b</sup>	3	38	6,0	93	1,1	840 mL g <sup>-1</sup> Carb	Andreani et al. (2015)
AFBR	10 <sup>a</sup>	12	-	5,0	-	1,7	2,0 mmol g <sup>-1</sup> DQO	Rosa et al. (2016)
UASB	25 <sup>a</sup>	-	100	5,5	-	0,39	39 mL g <sup>-1</sup> DQO	Intanoo et al. (2016)
UAFBR	9,5 <sup>b</sup>	4	241	4,5	91	0,25	0,86 mol mol <sup>-1</sup> Carb	Torres et al. (2017)
AnSBBR	14 <sup>b</sup>	4	-	6,0	88	0,7	0,7 mol kg <sup>-1</sup> Carb	Andreani et al. (2019)
AnSBBR	12 <sup>b</sup>	4	-	6,0	82	0,45	1,5 mol kg <sup>-1</sup> Carb	Andreani et al. (2019)
UAFBR	20 <sup>b</sup>	2	43	6,0	88	0,55	0,3 mol mol <sup>-1</sup> Carb	Corbari et al. (2019)
UASB	80 <sup>a</sup>	-	40	5,5	-	0,64	15 mL g <sup>-1</sup> DQO	Chavadej et al. (2019)
AnSBBR	11 <sup>b</sup>	4	96	6,0	98	0,98	1,4 mol kg <sup>-1</sup> Carb	Este trabalho
AnSBBR	15 <sup>b</sup>	3	112	6,0	97	1,2	1,78 mol kg <sup>-1</sup> Carb	Este trabalho

<sup>a</sup> Em termos de DQO (gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>); <sup>b</sup> Em termos de carboidratos (gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>).; \* (LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>).

De acordo com os estudos apresentados na Tabela 15, a presença de microrganismos competidores, como as bactérias lácticas, está entre os fatores que podem prejudicar a produção de hidrogênio quando a ARFM é utilizada como substrato, devido à competitividade das LAB com as bactérias produtoras de hidrogênio (NOIKE et al., 2002; LACERDA et al., 2005; ROSA et al., 2016; ANDREANI et al., 2019). Neste estudo, esse não foi um fator de interferência, uma vez que foram contabilizadas até  $10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> ou mesmo ausência de colônias desse microrganismo na ARFM e no efluente do AnSBBR, mantendo-se abaixo do relatado pela literatura para resíduos do processamento de mandioca, conforme verificado por Lacerda et al. 2005 ( $10^8$  a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup>) e Rosa et al. 2016 ( $10^1$  a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>).

A relação C/N média foi de  $96 \pm 23$  (ensaio I) e  $112 \pm 11$  (ensaio II), proporcionada pela codigestão entre água residuária e rama da mandioca utilizada como material suporte. De acordo com Anzola-Rojas et al. (2015) em reatores de leito fixo sugere-se que a relação C/N adequada seja em torno de 140. No entanto, foram reportados valores inferiores a essa faixa para os melhores resultados de produção de biohidrogênio a partir da ARFM (Tabela 15). A literatura cita o desbalanço nutricional da ARFM como uma das principais limitações em reatores acidogênicos de leito fixo, gerando instabilidade no processo fermentativo devido às alterações metabólicas, mudanças nas culturas dominantes e mudança no padrão de escoamento do reator pelo crescimento excessivo da biomassa, limitando a transferência líquido-gás e alteração nos produtos da fermentação (LIMA et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FLECK et al., 2017; ANDREANI et al., 2019). Esse comportamento não foi observado no presente estudo, diferenciando-se de outras pesquisas que estudaram a fermentação da ARFM. Torres et al. (2017) verificaram produção de hidrogênio de  $248,36 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e HY de  $0,86 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{Carb}$  em UAFBR tratando ARFM com COV de  $9,5 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e razão C/N de 241. Com o aumento da COV para  $13,5 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , a relação C/N foi reduzida para 25, diminuindo a produção e o HY para  $144,84 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $0,31 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{Carb}$ , respectivamente, observando-se acúmulo de biomassa e favorecimento da via metabólica do butanol. Corbari et al. (2019) reportaram o aumento da biomassa no reator UAFBR (COV de  $20 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) devido à baixas relações C/N (aproximadamente 20), o que ocasionou diminuição da COE<sub>A</sub> para valores inferiores a  $0,6 \text{ gCarb g}^{-1}\text{SSVd}^{-1}$ , após o 10º dia de operação. De acordo com os autores, sob condições limitantes, como a falta de substrato, as bactérias acidogênicas usam a energia disponível para a manutenção celular em vez da produção de metabólitos, o que resulta em menores rendimentos de hidrogênio.

Além de equilibrar a relação C/N, a adição das ramas de mandioca também aumentou a disponibilidade de nutrientes como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  de  $4,0 \pm 0,1$ ;  $409 \pm 83$ ;  $0,03 \pm 0,01$  e  $0,5 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ , para  $4,9 \pm 0,3$ ;  $521 \pm 58$ ;  $0,1 \pm 0,01$ ;  $0,6 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, agregando ainda o  $\text{Cu}^+$  ( $0,09 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ), que não havia sido detectado na água residuária bruta. Esse aumento na concentração de micronutrientes pode ter contribuído para o bom desempenho alcançado pelo reator em termos de PVH e HY até o 100º ciclo de operação do ensaio II. De acordo com Cheng et al. (2015), a hidrólise dos resíduos de mandioca possibilita o rápido aquecimento de substâncias polares presentes em sua estrutura, e, como resultado, tanto a superfície externa quanto a superfície interna dos resíduos são rompidas simultaneamente expondo os componentes lignocelulósicos, o que significa mais substrato e nutrientes sendo fornecidos para os microrganismos (CHEN et al., 2011; CHENG et al., 2015).

### 5.2.3 Efeito da adição das ramas de mandioca como material suporte na produção de hidrogênio

Ao longo dos ensaios I e II foi verificada degradação da estrutura física da CS (Figura 14), alterando a composição de lignina, celulose e hemicelulose, ao mesmo tempo em que houve aumento no teor de proteína das ramas (Tabela 16).

a)



b)

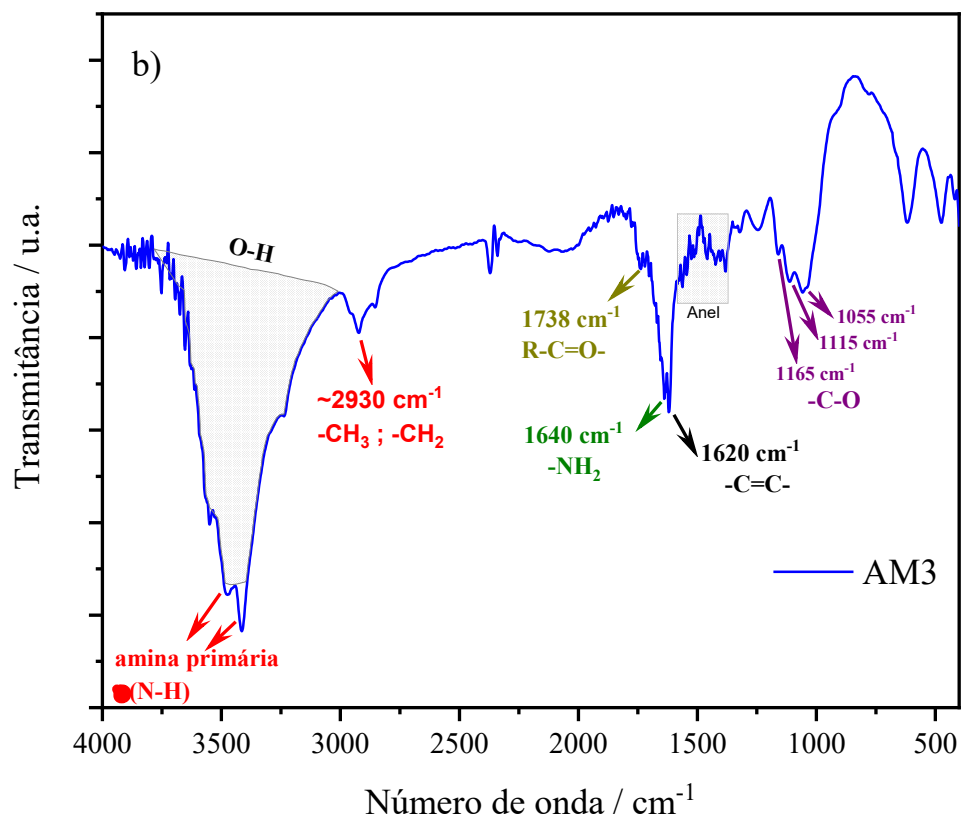
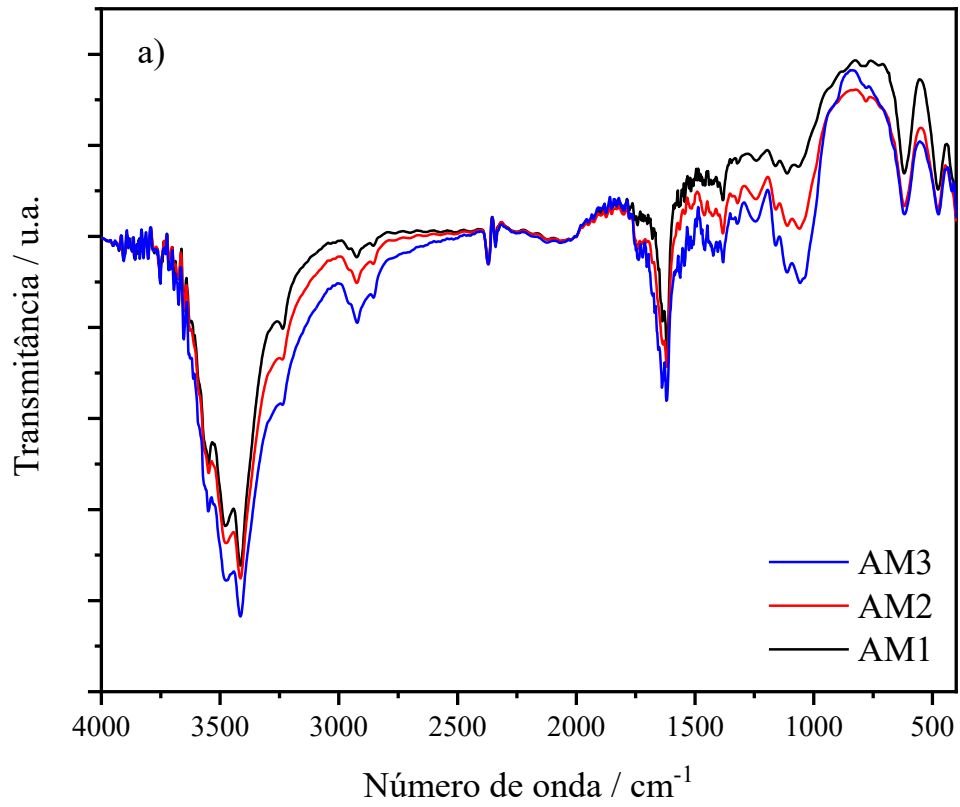


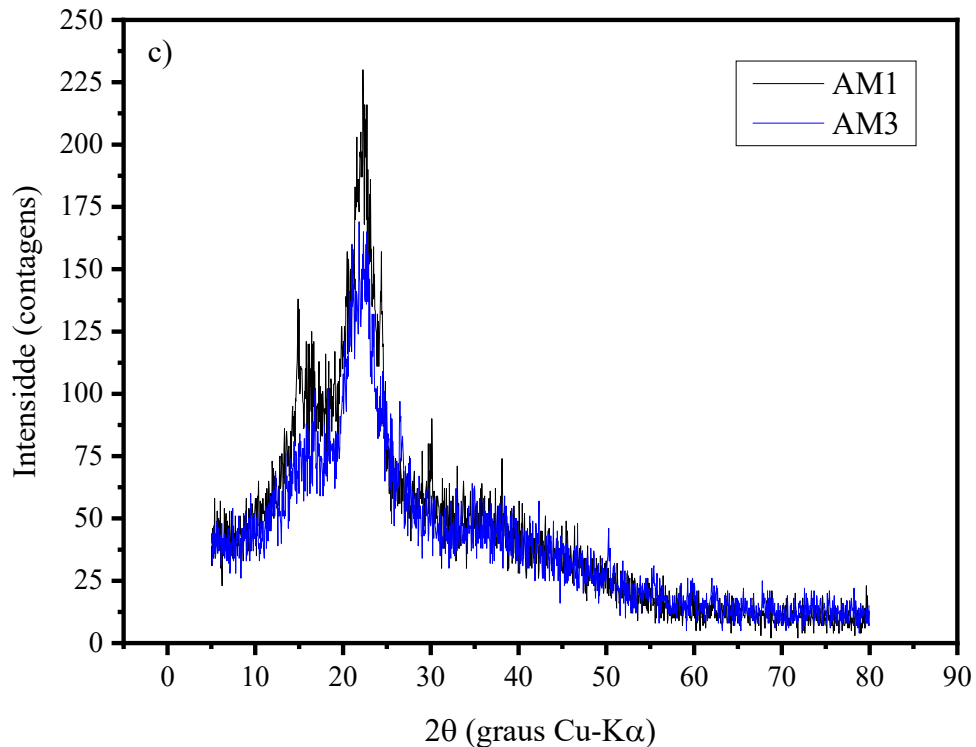
**Figura 14-** Rama de mandioca hidrolisada no início (a) e ao término (b) do período de operação do RA.

**Tabela 16** - Degradação da estrutura lignocelulósica e teor de proteína na CS ao longo dos ensaios acidogênicos.

	Degradação da composição lignocelulósica			Proteína (mg g <sup>-1</sup> )
	Lignina	Celulose	Hemicelulose	
	(%)	(%)	(%)	
CS <i>in natura</i>	-	-	-	1,8
Ensaio I	2	24	10	20,1
Ensaio II	4	36	19	34,2

Chavadej et al. (2019), verificaram degradação de até 43% da celulose presente nos resíduos da mandioca utilizados como cosubstratos em um UASB acidogênico, percentuais semelhantes aos verificados nos ensaios I e II (Tabela 16). Aliada à degradação da estrutura lignocelulósica, é possível observar o aumento expressivo nos teores de proteína presentes na CS, que apresentou um incremento de até 20 vezes no ensaio II (34,2 mg g<sup>-1</sup>), reforçando que houve imobilização celular ao longo do experimento. De acordo com Liu et al. (2020) e Alavi et al. (2017) o aumento da concentração de proteínas em materiais lignocelulósicos está diretamente relacionado ao crescimento e a adesão dos microrganismos aos poros do material suporte, indicando que a estrutura da CS favoreceu a imobilização celular. As amostras de rama *in natura* (AM 1), após a hidrólise ácida (AM 2) e ao final da operação do reator acidogênico (AM 3), tiveram sua caracterização estrutural realizada por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difratometria de raios-X (DRX), conforme apresentado na Figura 15. Na análise de FTIR (Figura 15a e 15b), ao comparar o comportamento das amostras AM1, AM2 e AM3 verifica-se que não houve desaparecimento ou aparecimento de novas bandas, indicando que os grupos funcionais da rama de mandioca se mantiveram ao longo do experimento (SCHWANNINGER et al., 2004). No entanto, a intensidade das bandas aumentou, indicando alteração estrutural, principalmente após a fermentação (AM 3).





**Figura 15** - a) Análise dos grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da CS *in natura* (AM 1), após hidrólise ácida (AM 2) e ao final de operação do reator (AM 3); b) identificação dos sinais evidenciados na análise FT-IR, c) DRX das amostras AM1 e AM3.

Em relação à identificação dos grupos funcionais da rama da mandioca (Figura 15a e 15b), as bandas identificadas entre  $1055-1165\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas às vibrações de alongamento do C-O, referentes à celulose, hemicelulose e lignina (LIU et al., 2020). Bandas verificadas no número de onda  $1620\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas às vibrações características dos anéis aromáticos na lignina (TEJADO et al., 2007; YUAN et al., 2010). O aumento da banda em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , remete ao grupamento amina ( $-\text{NH}_2$ ), característico de proteínas, confirmando a alteração no teor de proteína das ramas após a fermentação. Enquanto a banda característica em  $2930\text{ cm}^{-1}$  foi associada ao alongamento por flexão das ligações metil ( $-\text{CH}_3$ ) e metileno ( $-\text{CH}_2$ ). A banda identificada entre os comprimentos de onda  $3500$  e  $3400\text{ cm}^{-1}$  se deve à vibração do grupo hidroxila ( $-\text{OH}$ ) (LIU et al., 2020), confirmando que ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose foram parcialmente quebradas após a hidrólise e a fermentação. O aumento da intensidade dos sinais indica que após a hidrólise e a fermentação, o conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina na CS foi alterado, confirmando a degradação do material ao longo do processo fermentativo. Esse comportamento também foi verificado a partir da análise de DRX (Figura 15c), no qual além da existência de um alo amorfo próximo a  $20^\circ$  em ambos os difratogramas, não foi observado nenhum novo pico após o processo de fermentação, apenas o identificado em aproximadamente  $22^\circ$ , cuja intensidade foi reduzida em 16% após a fermentação (AM 3). Essa redução está relacionada a alteração na hemicelulose e lignina,

indicando que a região amorfa da rama foi aumentada, resultando na redução da cristalinidade da CS (LIU et al., 2020).

A alteração estrutural da CS ao longo da fermentação sugere que seu uso na imobilização celular possivelmente auxiliou na manutenção da concentração celular no reator devido à degradação da fração lignocelulósica. No ensaio I, a concentração de sólidos em suspensão voláteis no efluente se manteve em  $191 \pm 17 \text{ mg L}^{-1}$ . Com o aumento da COV de 11 para  $15 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a diminuição do tempo de ciclo de 4 para 3 h (ensaio II), houve aumento na PVH de até  $1,48 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e aumento gradativo na concentração de SSV para  $271 \pm 22 \text{ mg L}^{-1}$ . Nos últimos 36 ciclos do ensaio II a redução da PVH para  $0,67 \pm 0,08 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  coincidiu com o aumento na concentração de SSV no efluente para  $313 \text{ mgSSV L}^{-1}$ , que pode estar associada a degradação das ramas durante a operação do reator. Notou-se que a concentração de lignina no efluente acidogênico aumentou de aproximadamente  $22 \text{ mg L}^{-1}$ , ao final do ensaio I, para até  $88 \text{ mg L}^{-1}$ , ao final do ensaio II, indicando que o aumento na concentração de sólidos poderia estar relacionado à degradação da CS. Estudos de fermentação em reatores com biomassa imobilizada reportam baixas concentrações de sólidos no efluente, como Manssouri et al. (2013), que avaliaram a produção de hidrogênio em um AnSBBR com biomassa imobilizada em aparas de polietileno de baixa densidade e alimentado com água residuária sintética a base de sacarose ( $\text{COV } 12 \text{ e } 16 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Os autores verificaram que com a redução do tempo de ciclo de 4 para 3 h não houve aumento significativo na concentração de sólidos no efluente ( $172 - 176 \text{ mg L}^{-1}$ ), embora tenha ocorrido redução no rendimento de 2,83 para  $2,19 \text{ molH}_2 \text{ kgCarb}^{-1}$ , respectivamente.

Ao longo dos ensaios I e II a COEA manteve-se entre 0,8 e  $1,0 \text{ gCarb gSVTd}^{-1}$ , respectivamente, mantendo-se constante ao início e final de cada um dos ensaios. Valores reduzidos de COEA e elevados rendimentos de hidrogênio foram reportados na literatura em estudos conduzidos em AnSBBR alimentados com substratos a base de sacarose e com biomassa imobilizada em matrizes sintéticas. Manssouri et al. (2013) avaliaram a produção de hidrogênio em um AnSBBR com biomassa imobilizada, conforme indicado no parágrafo anterior. Em condições similares às aplicadas a esse estudo ( $\text{COV de } 12 \text{ e } 16 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), os autores verificaram que com a redução do tempo de ciclo de 4 para 3 h a COEA aumentou de 1,7 para  $2,3 \text{ kgCarb kgSVT}^{-1}\text{d}^{-1}$  enquanto houve redução no rendimento de 2,83 para  $2,19 \text{ molH}_2 \text{ kgCarb}^{-1}$ , respectivamente. Em condições operacionais semelhantes às de Manssouri et al. (2013), mas variando a estratégia de alimentação (batelada alimentada), Inoue et al. (2014) verificaram que com a redução do tempo de ciclo de 4h para 3h a COEA aumentou de 1,73 para

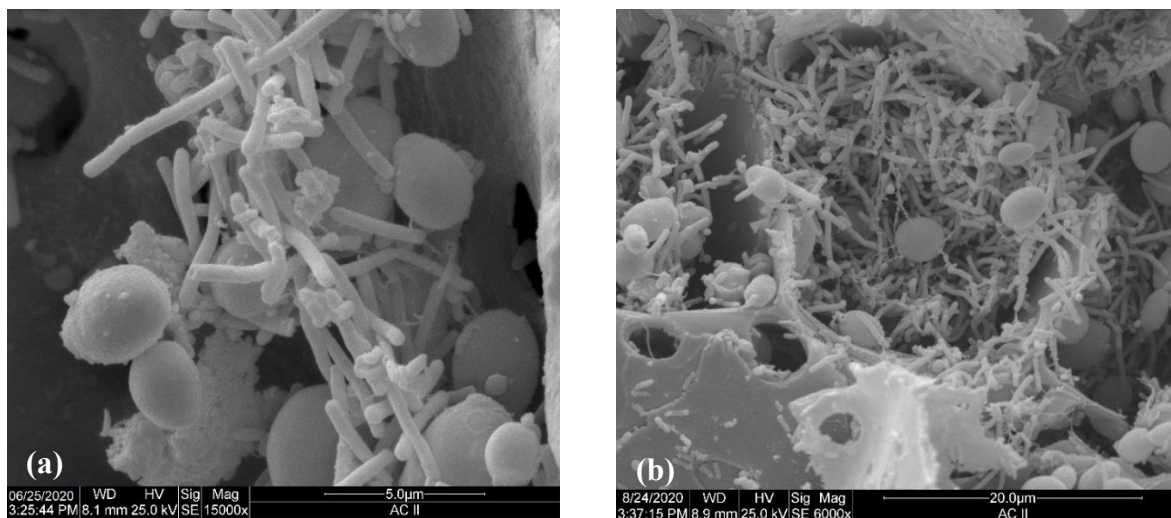
1,99 gCarb gSVTd<sup>-1</sup>, com redução no rendimento de hidrogênio de 4,34 para 4,27 molH<sub>2</sub> kgCarb<sup>-1</sup>. Em contrapartida, em estudos com a ARFM são reportados crescimento excessivo da biomassa, reduzindo a COEA e provocando a redução da produção de hidrogênio. Corbari et al. (2019) em um UAFBR alimentado com ARFM (COV 20 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), verificaram que o acúmulo de biomassa no reator ocasionou diminuição da relação F/M de 5,3 gCarb g<sup>-1</sup>SSVd<sup>-1</sup> para valores inferiores a 0,6 gCarb g<sup>-1</sup>SSVd<sup>-1</sup> já nos primeiros 10 dias de operação.

Considerando que a COEA se manteve constante do início ao final de cada um dos ensaios I e II, duas situações podem ser relacionadas: i) a degradação das ramas proporcionou incremento da concentração de carboidratos (entre 100 a 250 mg L<sup>-1</sup>); ii) a perda de parte do material suporte devido à degradação das ramas, contribuiu para manutenção da biomassa no reator. É importante mencionar que não foram identificadas alterações na rota metabólica dos ensaios (Figura 09), que justificassem o breve aumento na concentração SSV efluente ou a redução da produção de hidrogênio. Conforme mencionado no item 5.2.1, as concentrações de ácido propiônico mantiveram-se baixas, representando 5% do total de metabólitos, descartando-se alterações na rota metabólica. A possibilidade do envelhecimento da biomassa e predominância de organismos competidores como populações homoacetogênicas, que se utilizam do CO<sub>2</sub> como fonte de carbono e do H<sub>2</sub> como doador de elétrons para promover o crescimento celular (FERRAZ-JUNIOR et al. 2015; ANZOLA-ROJAS e ZAIAT, 2016), não foi evidenciada. A produção de ácido acético se manteve elevada e constante desde o início do ensaio I e ao longo de todo o ensaio II, assim como a produção de hidrogênio, que reduziu apenas nos últimos ciclos do ensaio II, sugerindo que a produção de ácido acético ocorreu a partir da rota heterotrófica (FUESS, 2017).

No ensaio II o aumento da COV para 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e a redução do tempo de ciclo para 3 h proporcionou o aumento da PVH média de 0,98±0,17 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para 1,21±0,2 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e do rendimento médio de 1,4 molH<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>Carb para 1,7 molH<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>Carb. Dessa forma, além do incremento da COV, a liberação de açúcares, oriundos da degradação da CS, pode ter colaborado com a oferta de substrato, contribuindo com a manutenção da COEA. No entanto, nos últimos 36 ciclos desse ensaio, observou-se o declínio de aproximadamente 44% da PVH e do HY, o que pode estar associado à degradação das ramas de mandioca, que, ao perder sua estrutura suporte, provocou perda da biomassa. Os materiais lignocelulósicos utilizados como materiais de suporte têm a vantagem de serem codigeridos durante a fermentação, embora haja uma lacuna na literatura quanto ao uso desses materiais em reatores anaeróbios operados por

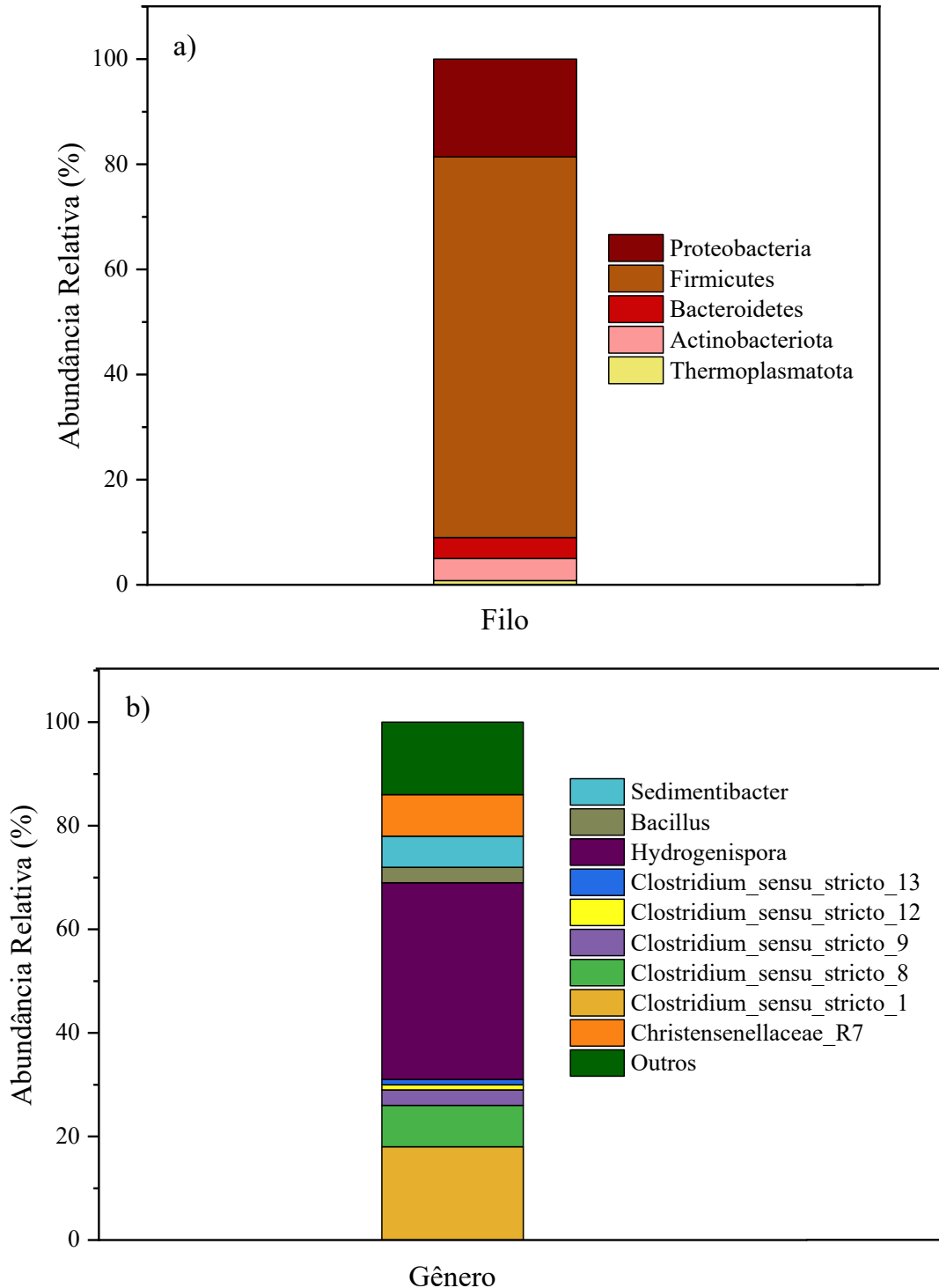
longos períodos. Ao mesmo tempo, também ocorreu o crescimento do biofilme durante a operação do reator, pois não foi realizada limpeza periódica ao longo dos ensaios ou entre eles. Em reatores anaeróbios com biomassa aderida, há uma interferência no contato das células com o substrato, uma vez que o substrato e os produtos metabólicos são distribuídos de forma desigual ao longo da profundidade do biofilme (MONTROYA-ROSALES et al., 2019). Isso ocorre porque o transporte de tais compostos para as camadas internas do biofilme é limitado pelo transporte de massa, conseqüentemente, a concentração de substrato nas camadas internas pode ser mínima quando a concentração de substrato na superfície do biofilme é relativamente baixa, o que pode levar os microrganismos a consumirem  $H_2$  (CONTRERAS-DÁVILA et al., 2017; MONTROYA-ROSALES et al., 2019).

A alteração na cristalinidade da parede celular da rama da mandioca, devido à hidrólise, conferiu características propícias à fixação dos microrganismos. Essa estrutura porosa favoreceu a adesão celular, resultando em uma relação microrganismos/material suporte de  $0,040 - 0,045 \text{ g}^{-1}\text{SVT g}^{-1}\text{suporte}$  nos ensaios I e II. A colonização do material por microrganismos semelhantes a leveduras e bacilos curvos, análogos ao *Clostridium* sp. (LIU et al. 2020), pode ser observada na Figura 16. Estruturas semelhantes a leveduras foram encontradas na ARFM bruta, o que pode ter contribuído para que esses microrganismos se mantivessem no reator acidogênico. A predominância dos bacilos curvos pode estar relacionada à diminuição na diversidade das culturas microbianas dominantes ao longo da operação do reator (GERARDI, 2003) em decorrência das características do substrato e seus nutrientes (YIN e WANG, 2016; YANG e WANG, 2019).



**Figura 16** - MEV da CS e biofilme do reator acidogênico: (a):  $COV 11 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e (b):  $COV 15 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$ .

A partir da análise metagenômica (Figura 17), verificou-se que a maioria dos microrganismos presentes no reator acidogênico ao final do ensaio II pertence ao filo *Firmicutes* (72,4%) e *Proteobacteria* (18,6%), enquanto os 9% restantes pertencem aos filios *Bacteroidetes*, *Actionobacteriota* e *Thermoplasmatota*. *Firmicutes* e *Proteobacteria* são filios comumente relatados na fermentação de substratos ricos em carboidratos (YANG e WANG, 2019; CHEN et al., 2021).



**Figura 17** - Abundância relativa de bactérias: a) filo; b) gênero.

A composição microbiológica em relação ao gênero foi complexa, indicando maior diversidade de espécies. Houve predominância do gênero *Hydrogenispora* (38%) seguido dos gêneros *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*; *stricto\_8*; *stricto\_9*; *stricto\_12* e *stricto\_13* (totalizando 32%), enquanto os 30% restantes pertencem a outros grupos como *Bacillus*, *Sedimentibacter*, *Christensenellaceae\_R7*, entre outros. *Hydrogenispora* é um gênero de bactérias fermentativas que podem utilizar a celulose como única fonte de carbono e energia, produzindo H<sub>2</sub>, etanol e acetato através da decomposição de substratos lignocelulósicos (UNGLKULPASVICH et al., 2021). Enquanto os microrganismos do gênero *Clostridium* são conhecidos por serem fermentativos e produtores de hidrogênio (LIU et al., 2020; CHEN et al., 2021). Portanto, a adição da CS, bem como a disponibilidade de carboidratos oriundos da sua degradação, favoreceu o estabelecimento desses microrganismos no reator, resultando na degradação de estruturas complexas e em elevados teores de hidrogênio no biogás.

O crescimento da biomassa no material suporte também foi confirmado a partir da análise de polissacarídeos totais (PLT) e proteínas totais (PT) presentes nas substâncias poliméricas extracelulares do biofilme. As concentrações de PLT nos ensaios I e II foram de 71,1 mg L<sup>-1</sup> e 73,3 mg L<sup>-1</sup>, enquanto as concentrações de PT foram de 30,2 e 32,3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. De acordo com Bassin et al. (2016), o aumento na carga orgânica tende a aumentar também a espessura do biofilme devido ao crescimento celular proporcionado pela disponibilidade de substrato. Quando ocorre aumento brusco da espessura do biofilme, pode ocorrer desprendimento do material, levando à perda da biomassa (ZHANG et al., 2014, BASSIN et al., 2016). Considerando que os PLT são polímeros hidrofílicos, enquanto que as PT são hidrofóbicas, a relação PT/ PLT revela as características e a espessura do biofilme (JORAND et al., 1998; HAN et al., 2018), pois quanto maior a relação PT/ PLT (> 0,2), mais compacto e resistente é o biofilme (HUANG et al., 2019). Neste caso, foram obtidas relações PT/ PLT médias de 0,42 e 0,45 para as COVs 11 e 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente, constatando-se que o biofilme se tornou ligeiramente mais resistente com o aumento da COV.

Na literatura, os estudos abordam a fermentação da ARFM com imobilização celular principalmente em matrizes sintéticas para obtenção de leito poroso, como aparas de polietileno (TORRES et al., 2017; TONELLO et al. 2018; ANDREANI et al., 2019; CORBARI et al., 2019), embora também tenham sido reportadas pesquisas utilizando materiais naturais como bambu (ANDREANI et al., 2015; TORRES et al., 2017). Conforme mencionado anteriormente, um dos fatores que podem ter contribuído para o desempenho do RA foi o equilíbrio no crescimento de microrganismos proporcionado pela imobilização nas CS, diferentemente do

reportado por estudos que utilizaram matrizes sintéticas, como Torres et al. (2017); Corbari et al. (2019) e Andreani et al. (2019).

O uso de materiais orgânicos e lignocelulósicos, como materiais suporte, oferece como vantagem a possibilidade de serem codigeridos durante a fermentação, embora os estudos que abordam essa técnica de imobilização ainda sejam preliminares, principalmente considerando a operação em sistemas contínuos. Há uma lacuna na literatura sobre o uso de materiais semelhantes à rama como material suporte em experimentos com longos tempos de duração. Planklang et al. (2012) avaliaram a imobilização celular no bagaço da cana-de-açúcar utilizando água residuária sintética a base de sacarose com concentração de  $25\text{g L}^{-1}$ . Os autores avaliaram o material suporte após 5 bateladas sequenciais de 24 h cada e verificaram que durante o experimento não houve redução da PVH ( $2,16 - 3,06 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e do HY ( $0,81 - 1,34 \text{ molH}_2 \text{ molCarb}^{-1}$ ), no entanto, o experimento não foi conduzido por um período superior a 5 dias. Liu et al. (2020) avaliaram a alteração das propriedades do bagaço de cana-de-açúcar utilizado na imobilização celular em um ASBR destinado a coprodução de hidrogênio e butanol a partir de água residuária sintética a base de glicose ( $60\text{g L}^{-1}$ ). A análise do material suporte foi realizada após 4 bateladas de 3 dias cada, verificando-se eficiência na alteração da composição lignocelulósica do bagaço, e, conseqüentemente, da imobilização celular. Entretanto, os autores não verificaram qual seria o comportamento desse material em bateladas sequenciais operadas em tempo superior a 12 dias, ou mesmo em reatores contínuos. Até o momento de conclusão deste trabalho, não foram verificados outros estudos na literatura que abordassem o uso de materiais lignocelulósicos como suporte em reatores anaeróbios operados em bateladas e nenhum outro estudo reportou essa estratégia de imobilização durante a fermentação de águas residuárias agroindustriais.

#### 5.2.4 Considerações finais Fase II

O ensaio II ( $15 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e TC de 3 h) apresentou a maior produtividade ( $1,2 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e rendimento ( $1,7 \text{ molH}_2 \text{ kgCarb}^{-1}$ ) de hidrogênio. Assim como nos ensaios preliminares (Fase I), observou-se a predominância da rota metabólica do acetato-etanol, representando mais de 80% dos metabólitos gerados durante a fermentação da ARFM. Essa rota pode ter sido favorecida pela degradação da estrutura polímero aromática das ramas de mandioca, cuja composição lignocelulósica foi degradada em até 36%, contribuindo com aumento de até  $250 \text{ mgCarb L}^{-1}$  no substrato. Aliado à degradação da CS, houve aumento dos microrganismos aderidos ao material suporte, com destaque para os gêneros *Hydrogenispora* e

*Clostridium*. No entanto a degradação da estrutura das ramas de mandioca pode ter contribuído para redução na produção de hidrogênio ( $0,67 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) observada ao final deste ensaio.

### 5.3 FASE III - AnSBBR METANOGENICO

O AnSBBR metanogênico foi alimentado com o efluente oriundo do reator acidogênico. A fim de avaliar o desempenho do reator quanto à produção de metano, foram conduzidos quatro ensaios nos quais o aumento da COV ( $4 - 16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) esteve atrelado à diminuição do tempo de ciclo ( $24 - 6 \text{ h}$ ), enquanto a concentração de matéria orgânica no afluente foi mantida constante ( $5 \text{ gDQO L}^{-1}$ ).

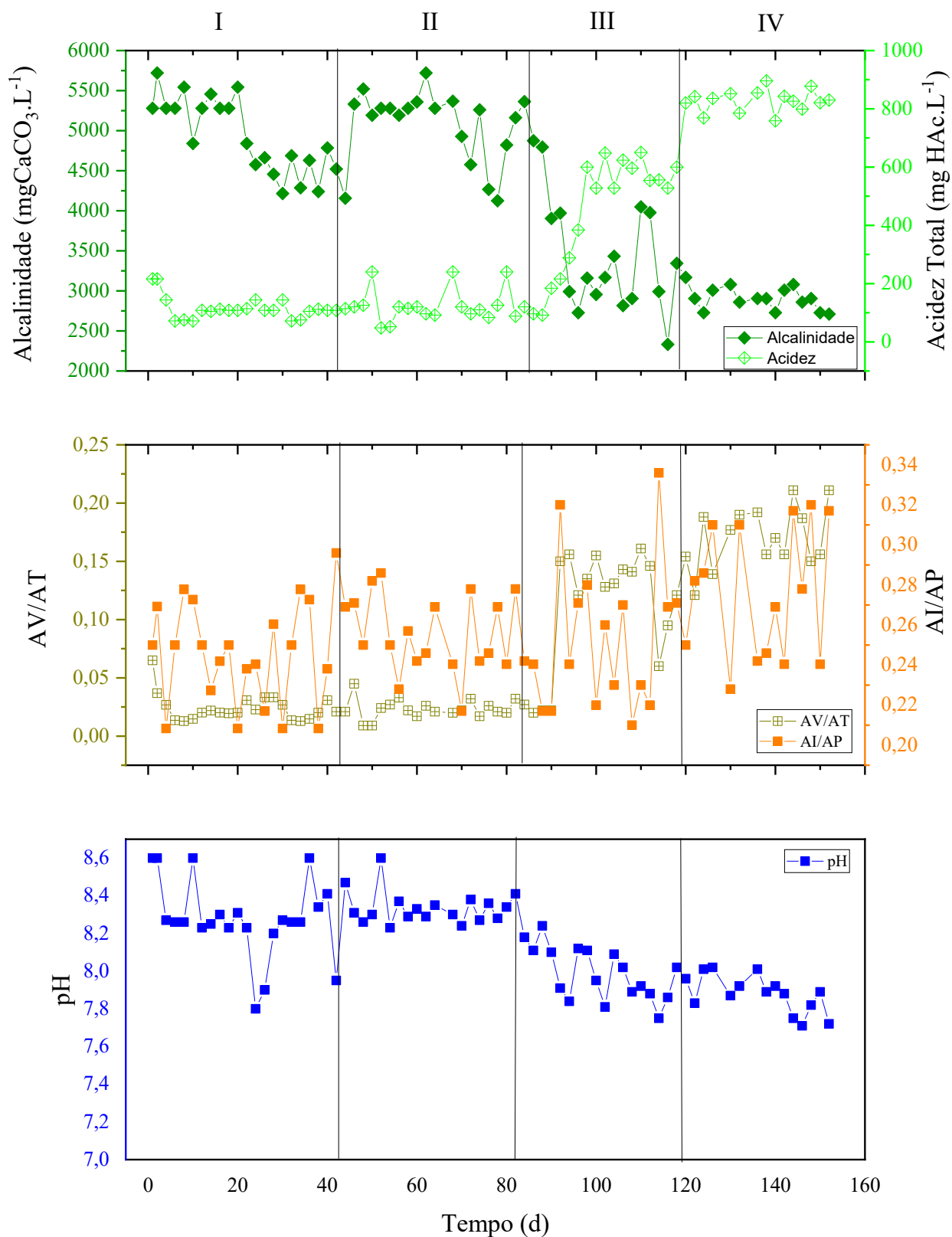
#### 5.3.1 Monitoramento do AnSBBR metanogênico em relação ao pH, alcalinidade e conversão de metabólitos

O aumento da COV de 4 para  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  provocou decréscimo gradativo no pH e na alcalinidade, enquanto houve aumento da acidez volátil total (Tabela 17 e Figura 18).

**Tabela 17** - Indicadores de monitoramento do AnSBBR metanogênico para as condições testadas.

Ensaio	COV ( $\text{gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Tempo de ciclo (h)	pH efluente	Alcalinidade Parcial ( $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ )		Acidez volátil total ( $\text{mgHAc L}^{-1}$ )		AV/AT
				Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	
I	4	24	$8,2 \pm 0,2$	$1760 \pm 73$	$4139 \pm 340$	$2352 \pm 240$	$120 \pm 32$	$0,026 \pm 0,009$
			<b>8,6</b>	<b>1936</b>	<b>4840</b>	<b>2880</b>	<b>216</b>	
II	8	12	$8,3 \pm 0,1$	$1820 \pm 53$	$5189 \pm 239$	$2488 \pm 297$	$118 \pm 34$	$0,023 \pm 0,006$
			<b>8,6</b>	<b>2176</b>	<b>5460</b>	<b>2920</b>	<b>240</b>	
III	12	8	$8,0 \pm 0,1$	$1811 \pm 23$	$3299 \pm 327$	$2263 \pm 286$	$634 \pm 96$	$0,171 \pm 0,02$
			<b>8,2</b>	<b>2190</b>	<b>3977</b>	<b>2678</b>	<b>711</b>	
IV	16	6	$7,8 \pm 0,1$	$1860 \pm 224$	$3001 \pm 129$	$2364 \pm 376$	$854 \pm 98$	$0,221 \pm 0,03$
			<b>8,02</b>	<b>2200</b>	<b>3277</b>	<b>2760</b>	<b>976</b>	

AV/AT: relação acidez total e alcalinidade total. \*\*Os valores em negrito representam os valores máximos.



**Figura 18** - Variação temporal do pH, acidez total, alcalinidade, AI/AP e AV/AT no reator metanogênico.

Em média o pH efluente manteve-se em 8,1 com valores máximos de 8,6 no ensaio I (COV de  $4,0 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e mínimo de 7,8 para o ensaio IV (COV de  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Nota-

se que apesar da diminuição gradual do pH efluente, os valores se mantiveram acima da faixa considerada limite (6,7) para o metabolismo das arqueas metanogênicas (DEUBLIN e STEINHAUSER, 2008; FENG et al. 2020). O aumento da COV de 4 para 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> entre os ensaios I e IV proporcionou redução no pH de 8,2 para 7,8, com redução na capacidade de tamponamento do reator, diminuindo a alcalinidade de 4139±340 para 3001±129 em decorrência do aumento da concentração de ácidos no efluente de 120±32 para 854±98 mg L<sup>-1</sup>.

Em reatores metanogênicos, o pH efluente tende a ser mais elevado do que o pH afluente devido à clivagem do acetato em metano e bicarbonato pelas arqueas acetoclásticas (Eq. 27), gerando alcalinidade (RITMANN e MacCARTY, 2001; KAINTHOLA et al., 2019). Portanto, pHs entre 8 e 9 são comumente reportados na literatura (FERRAZ -JUNIOR et al., 2016; FUESS et al., 2017b; VOLPINI et al., 2018; MARI et al., 2020), mesmo estando acima dos valores considerados ótimos para metanogênese (7,3) (ANGELIDAKI et al., 2005; FENG et al., 2020)



A adição de aproximadamente 2,2 gNaHCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> para estabilizar o pH afluente em 7,0 manteve a relação NaHCO<sub>3</sub>/DQO na faixa de 0,34 a 0,45 em todos os ensaios. A reação representada na Eq. 28 demonstra a neutralização dos ácidos orgânicos (HA) pelo alcalinizante (RITTMANN e MCCARTY, 2001; KAINTHOLA et al., 2019).



Em relação a outros trabalhos que analisaram digestão anaeróbia em duas fases, a relação NaHCO<sub>3</sub>/DQO empregada nos ensaios I a IV (0,34 – 0,45) é correspondente à faixa verificada por Ferraz-Junior (2016) e Fuess (2017) que utilizaram relações NaHCO<sub>3</sub>/DQO de 0,36 e 0,28 respectivamente, para manter o pH afluente próximo de 7,0, obtendo rendimentos de metano de até 316 e 329 mLCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>. Em contrapartida, Bezerra et al. (2011) verificaram que para garantir a estabilidade em um AnSBBR de fase única destinado ao tratamento de resíduos da produção de biodiesel foram necessárias relações NaHCO<sub>3</sub>/DQO quase cinco vezes maiores (até 1,3 gNaHCO<sub>3</sub> gDQO<sup>-1</sup>) do que as observadas em sistemas operados em duas fases. De acordo com O-Thong et al. (2018), a manutenção da alcalinidade à bicarbonato na faixa de 1000 – 5000 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> colabora para estabilidade na produção de metano. Nesse trabalho, verificou-se que a alcalinidade efluente, embora tenha apresentado redução no ensaio IV, manteve-se acima de 3000 mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>.

A redução da alcalinidade no ensaio IV corresponde ao maior valor de AV no efluente ( $854 \pm 98 \text{ mgHAc L}^{-1}$ ) e da relação AV/AT ( $0,221 \pm 0,03$ ). No entanto, apesar do aumento, a relação AV/AT ainda permaneceu abaixo da faixa recomendada (0,5) para manutenção da estabilidade de reatores metanogênicos alimentados com ARFM (SÁNCHEZ et al., 2005; WATTHIER et al., 2019). Segundo Ripley et al. (1986), as principais evidências de desestabilização em reatores metanogênicos comumente estão relacionadas a brusca redução no pH e ao aumento expressivo da concentração de  $\text{CO}_2$  no biogás, o que não foi observado em nenhuma das condições analisadas.

A estabilidade do reator também foi verificada a partir da relação AI/AP (Figura 18). Observa-se que o aumento da carga orgânica ocasionou seu aumento, atingindo o pico de 0,33 no ensaio IV. O valor considerado limite na relação AI/AP é variável na literatura. A princípio, Ripley et al. (1986) consideraram que em reatores metanogênicos a operação é estável quando a relação AI/AP é inferior a 0,3, embora valores maiores possam ocorrer em processos estáveis. Algumas pesquisas (MARTÍN-GONZALES, 2013; WATTHIER et al., 2019 e MARI et al., 2020) demonstraram que em condições de alcalinidade efluente na faixa de  $3000\text{-}4000 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , relações AI/AP de até 0,4 são indicativos de estabilidade, sendo esses valores adotados como referência para o presente estudo. Dessa forma, considera-se que todos os ensaios se mantiveram estáveis, com relação AI/AP variando entre 0,2 e 0,33.

O aumento da COV de 12 para  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a diminuição do tempo de ciclo de 8 h (ensaio III) para 6 h (ensaio IV) contribuíram para o aumento da concentração dos AOV observado no efluente, diminuindo o desempenho do reator em relação à conversão de metabólitos. Na Figura 18, observa-se que aproximadamente na metade do ensaio III a acidez volátil total aumentou de 300 para  $600 \text{ mgHAc L}^{-1}$ , provocando redução no pH efluente de 8,2 para 7,8 e aumentando as relações AV/AT e AI/AP de 0,023 e 0,2 para 0,17 e 0,27, respectivamente. Apesar do aumento, esses valores se mantiveram dentro da faixa de estabilidade indicada pela literatura (0,5 e 0,4). Esse comportamento também foi observado ao longo de todo o ensaio IV, no qual a concentração de ácidos totais no efluente aumentou de  $600 \text{ mg L}^{-1}$  para  $854 \pm 58 \text{ mg L}^{-1}$ .

A Tabela 18 apresenta a quantificação dos metabólitos solúveis no efluente dos ensaios I, II, III e IV. Conforme discutido anteriormente, no efluente do reator acidogênico foram observadas concentrações mais elevadas de ácido acético e etanol, indicando que a rota do acetato-etanol foi a principal via metabólica durante a fermentação da ARFM. Considerando que no afluente do reator metanogênico a concentração total de metabólitos solúveis foi de

aproximadamente  $4519 \pm 314$  mgDQO L<sup>-1</sup>, verificou-se eficiências conversão de 95%; 93%; 75% e 65% para os ensaios I, II, III e IV, respectivamente.

**Tabela 18** - Concentração média dos metabólitos solúveis presentes no efluente do reator metanogênico.

Metabólitos (mgDQO L <sup>-1</sup> )						
Ensaio	HLa	HBu	HAc	HPr	Etanol	Total
I	12 ± 10	n.d.	97±42	66±23	27±12	202
II	n.d.	n.d.	265±37	n.d.	50±11	317
III	n.d.	n.d.	503±43	100±11	411±32	1014
IV	90±51	n.d.	748±63	84±9	619±56	1541

HLa – Ácido láctico; HBu – Ácido Butírico; HAc – ácido acético; HPr – Ácido propiônico.

No efluente do reator metanogênico foi verificada a presença dos ácidos láctico, acético, propiônico e etanol. A predominância do ácido acético no efluente se deve, possivelmente, a conversão dos demais ácidos orgânicos em acetato, processo característico do metabolismo dos microrganismos acetogênicos (MARI et al., 2020). Além disso, é importante salientar a ação das bactérias sintróficas acetogênicas, ou seja, apesar do consumo dos AOV, também há geração desses metabólitos devido ao complexo consórcio microbiano presente no reator metanogênico (GUO et al., 2014, WANG et al., 2018a; KAINTHOLA et al., 2019).

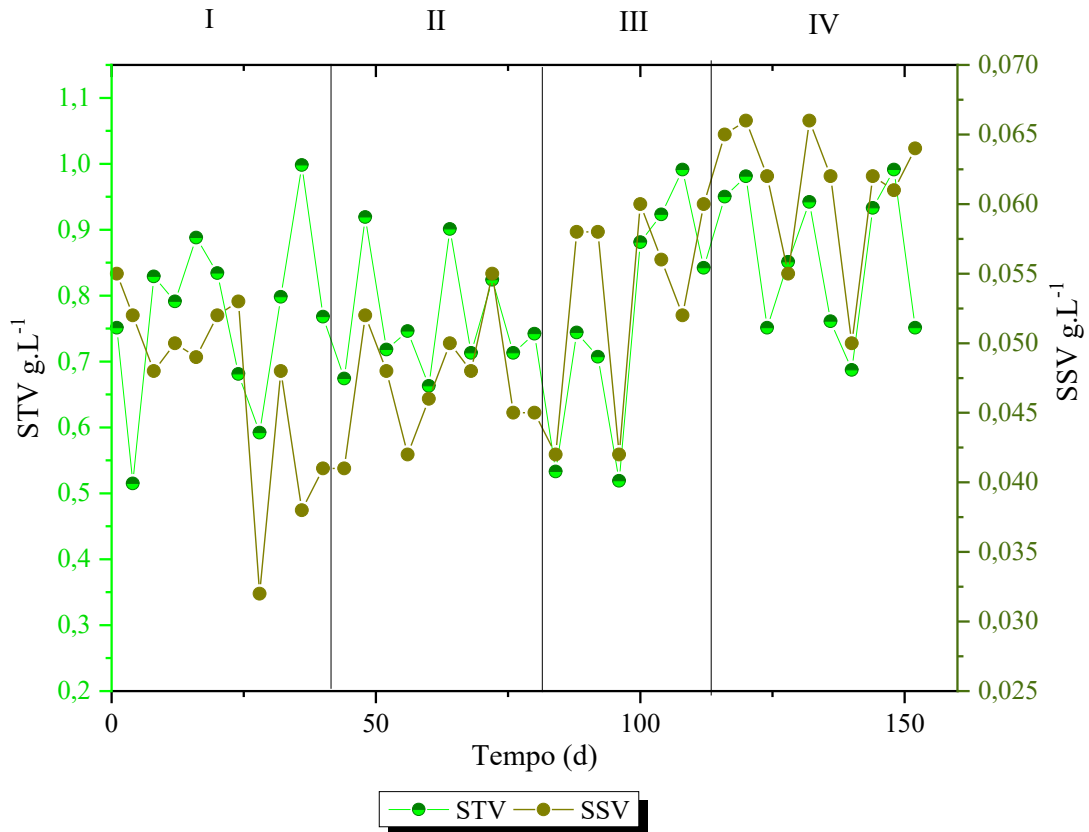
Os ensaios I e II (COV de 4,0 e 8,0 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) com tempos de ciclo de 24 e 12 h, apresentaram as maiores eficiências de conversão de metabólitos (95 e 93%), resultando em concentrações inferiores a 300 mgDQO L<sup>-1</sup> no efluente. Conforme mencionado anteriormente, o tempo de ciclo é um fator determinante na digestão anaeróbia, inclusive devido à cinética lenta do metabolismo metanogênico, que apresenta taxa de crescimento específico máxima ( $\mu_{max}$ ) de 0,6 d<sup>-1</sup> (ANGELIDAKI et al., 2005). Neste caso, verificou-se que o tempo de ciclo de 12 h foi suficiente para os microrganismos do AnSBBR metabolizarem quase 100% dos metabólitos presentes no afluente. Ressalta-se que mesmo em tempos de ciclo de 8 e 6 h, o reator apresentou eficiências de conversão de metabólitos acima de 65%.

A concentração de etanol no efluente dos ensaios I e II (20 e 50 mgDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente) pode estar relacionada a menor energia demandada para conversão desse subproduto em acetato ( $\Delta G = +9,6$  kJ mol<sup>-1</sup>) (WANG e ZHAO, 2009) quando comparada à energia dos ácidos butírico e propiônico. Houve baixa concentração de propionato no efluente metanogênico devido à menor concentração desse metabólito no afluente (aproximadamente 170 mgDQO L<sup>-1</sup>), o que colaborou para a estabilidade operacional do reator. Em reatores

metanogênicos, o acúmulo de ácido propiônico pode produzir efeitos tóxicos sobre as arqueas metanogênicas (LI et al., 2012; FUESS et al., 2017b). Nesse estudo, não foi detectado HPr no efluente do ensaio II, enquanto foram observadas baixas concentrações nos ensaios I, III e IV, compondo relação HPr/HAc de 0,48; 0,15 e 0,08, respectivamente. Esses valores encontram-se abaixo do limite de 1,4 associado à estabilidade operacional de reatores metanogênicos alimentados com substratos acidificados (HILL et al., 1987; FUESS, 2017).

Embora a concentração de AOV tenha aumentado com o incremento da COV, as concentrações encontradas no ensaio IV (COV 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 6 h) mantiveram-se abaixo do reportado na literatura para pesquisas em condições semelhantes ao deste estudo. Jiraprasertwong et al. (2017) verificaram concentrações de AOV de aproximadamente 300 mg L<sup>-1</sup> para COV de 15 kgDQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> em UASB metanogênico, mas ao aumentar a COV para 18 kgDQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>, foi observada inibição da produção de metano devido à drástica acidificação do reator, cuja concentração passou a ser de aproximadamente 4800 mg L<sup>-1</sup>. Mari et al. (2020), verificaram concentrações de AOV superiores a 1500 mg L<sup>-1</sup> com a redução do tempo de ciclo de 8 para 6 h (COV de 12 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) em um reator AnSBBR alimentado com ARFM acidificada, no entanto, de acordo com os autores, não foi observada acidificação do sistema ou inibição da produção de metano, de forma semelhante ao observado no presente estudo.

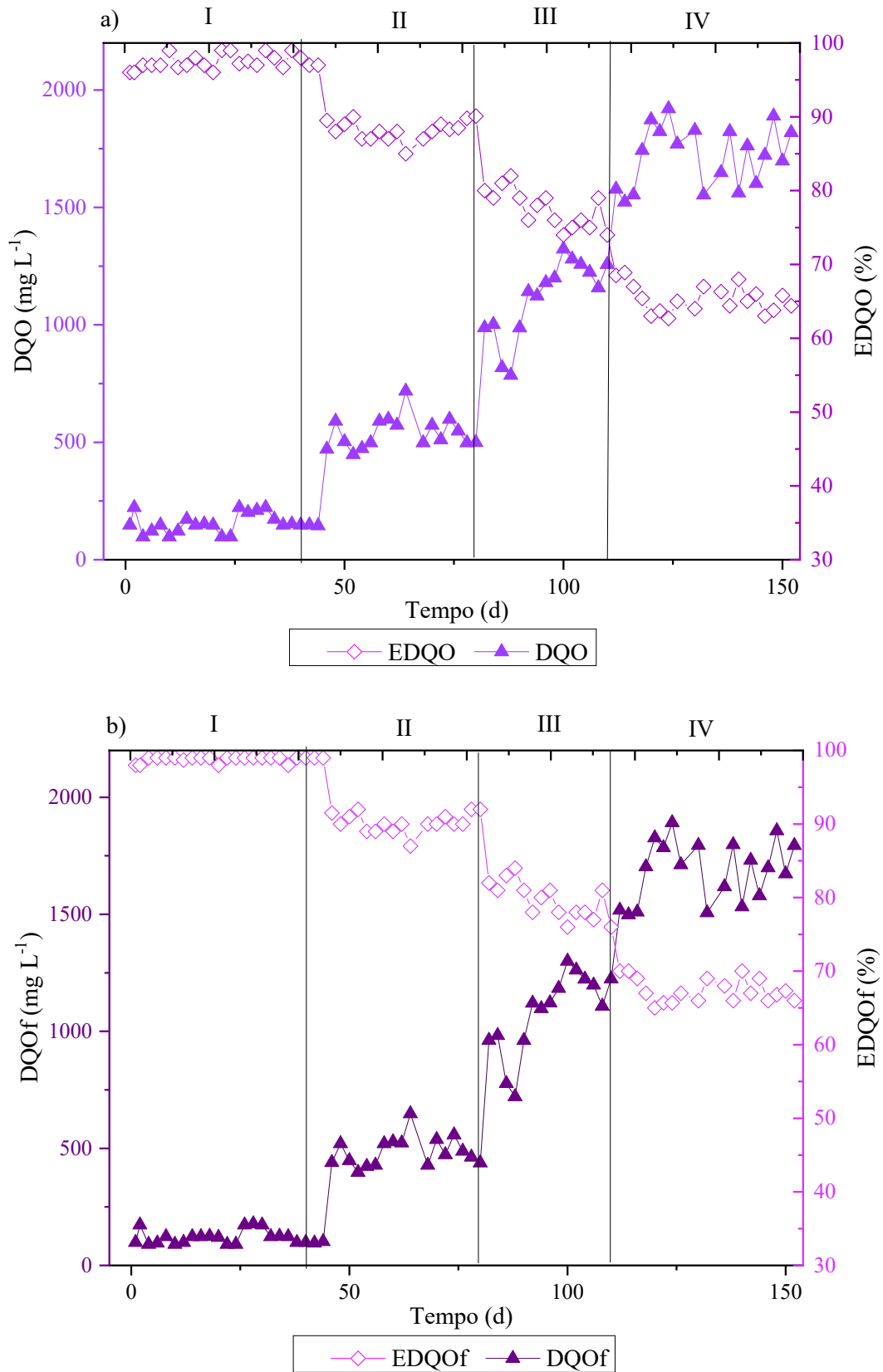
A concentração média de sólidos totais (ST) no afluente do reator foi de 2,2±0,9 g L<sup>-1</sup>, enquanto as concentrações médias no efluente dos ensaios I, II, III e IV foram de 1,6±0,2; 0,9±0,3; 1,1±0,4 e 1,3±0,4 gST L<sup>-1</sup>, respectivamente. As concentrações de SVT e SSV ao longo do experimento são apresentadas na Figura 19. A concentração de SVT no efluente manteve-se na faixa de 0,6 a 0,95 g L<sup>-1</sup>, correspondendo entre 70% a 90% dos sólidos totais quantificados no efluente. Nos ensaios I e II a concentração média de SSV no efluente foi de 0,045 g L<sup>-1</sup>, aumentando para 0,057 e 0,063 g L<sup>-1</sup>, nos ensaios III e IV, respectivamente. O aumento observado ao final da fase III e ao longo de toda a fase IV, pode ser atribuído à redução do tempo de ciclo para 6 h e aumento da COV para 16gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Bezerra et al. (2011) e Lovato et al. (2012) também reportaram baixa concentração de SVT (1,6 – 1,4 g L<sup>-1</sup>) e SSV (0,034 – 0,029 g L<sup>-1</sup>) no efluente de um AnSBBR alimentado com efluente da produção de biodiesel (COV - 6,0g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e biomassa imobilizada em espuma de poliuretano. De acordo com os autores, a baixa concentração e SSV no efluente dos ensaios indica a eficiência da capacidade de retenção de sólidos do reator em condições de aumento da COV.



**Figura 19** – Variação temporal nas concentrações de SVT e SSV do efluente metanogênico ao longo do experimento.

### 5.3.2 Desempenho do AnSBBR metanogênico em relação à remoção de DQO

Observa-se na Figura 20 o monitoramento da concentração de matéria orgânica no efluente, bem como a eficiência de remoção de DQO em todos os ensaios. Em média, foram verificadas eficiências de remoção da DQO filtrada de  $99 \pm 0,2\%$ ;  $90 \pm 0,9\%$ ;  $80 \pm 0,9\%$  e  $67 \pm 1,4\%$  para os ensaios I, II, III e IV, respectivamente. Os ensaios I (COV de  $4,0 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e II ( $8,0 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) apresentaram as maiores eficiências de remoção de DQO de 99,9% e 90%, respectivamente. As elevadas eficiências de remoção de DQO estão relacionadas aos maiores tempos de ciclo verificados nestes ensaios, pois a eficiência de remoção de matéria orgânica manteve-se elevada mesmo após a redução de 50% do tempo de ciclo do ensaio I (24 h) para o ensaio II (12 h).



**Figura 20** - Remoção de matéria orgânica ao longo dos experimentos I a IV: a) DQO - DQO total do efluente; EDQO - eficiência de remoção DQO total; b) DQOf - DQO filtrada do efluente; EDQOf - eficiência de remoção DQO filtrada.

A eficiência de remoção de DQO no ensaio III (TC de 8h) manteve-se na faixa de 72 a 80% e foi menor do que a verificada no ensaio II (90%), no entanto, esses valores estão acima da média reportada na literatura (70%) para sistemas em duas fases (O-THONG et al., 2018). As menores eficiências (65 - 69%) foram observadas no ensaio IV (COV de 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), com tempo de ciclo de 6 h. Em condições de longo tempo de ciclo há uma tendência de que o substrato seja consumido quase em sua totalidade, conforme observado nos ensaios I e II, resultando em DQO efluente residual composta principalmente por matéria orgânica recalcitrante ou biomassa arrastada (RAMOS e SILVA, 2020). A redução do tempo de ciclo implica em menor tempo hábil para os microrganismos consumirem os metabólitos solúveis, sobretudo as arqueas metanogênicas, o que pode resultar, portanto, em acúmulo de AOV no reator e inibição da metanogênese (CREMONEZ et al., 2021), o que não foi verificado no presente estudo. A Tabela 19 apresenta os valores de carga orgânica removida e carga orgânica específica verificadas no reator metanogênico.

**Tabela 19** – Variações na carga orgânica aplicada e específica do reator AnSBBR metanogênico.

Parâmetros	Ensaio			
	I	II	III	IV
$\epsilon$ DQO (%)	99±0,2	90±0,9	80±0,9	67±1,4
COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	4,0	8,0	12,0	16,0
COV <sub>R</sub> (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	3,92±0,3	7,18±0,2	9,7±0,3	10,7±0,4
COE <sub>A</sub> (gDQO g <sup>-1</sup> SVTd <sup>-1</sup> )	0,325±0,06	0,655±0,03	1,120±0,13	1,360±0,11
COE <sub>R</sub> (gDQO g <sup>-1</sup> SVTd <sup>-1</sup> )	0,321±0,02	0,648±0,06	0,796±0,02	0,955±0,09

COV<sub>R</sub> – Carga orgânica volumétrica removida; COE<sub>A</sub> – Carga orgânica específica aplicada; COE<sub>R</sub> – Carga orgânica específica removida.

Nos ensaios II, III e IV a diminuição do tempo de ciclo para 12, 8 e 6 h resultou na diminuição da eficiência de remoção de DQO para 90, 80 e 67%, ao mesmo tempo em que foi verificado o aumento gradual na acidez volátil de 118 mgHAc L<sup>-1</sup>, (ensaio II) para 634 mgHAc L<sup>-1</sup> (ensaio III) e 854 mgHAc L<sup>-1</sup> (ensaio IV). Essa redução no desempenho do reator pode estar relacionada ao aumento da carga orgânica, que aumenta o aporte de matéria orgânica

no reator, e à diminuição do tempo necessário para metabolizar todo o substrato disponível (MARI et al., 2020), conforme discutido no item 5.3.1.

Os valores da  $COE_A$  dos ensaios I ao IV reportados na Tabela 19 são condizentes com a COE de até  $2,0 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}^{-1}$  recomendada para reatores metanogênicos operando em condições estáveis (CHERNICHARO, 2016), embora esse valor possa variar conforme o substrato. Alguns estudos apresentaram faixas semelhantes de  $COE_A$ , em reatores AnSBBR metanogênicos utilizando efluente acidificado como substrato com COVs semelhantes às utilizadas nesse estudo ( $8 - 12 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), tais como Lullio et al. (2014) e Mari (2018), que obtiveram  $COE_A$  de  $0,43$  e  $1,03 \text{ gDQO gSVT}^{-1}\text{d}^{-1}$ , respectivamente. Ao comparar a  $COE_A$  com a  $COE_R$  de todos os ensaios do presente estudo, observou-se que os microrganismos foram capazes de estabilizar eficientemente a matéria orgânica inserida no reator, mesmo para cargas orgânicas mais elevadas como nos ensaios III e IV. Em relação à eficiência de remoção da COV, os valores de  $COV_R$  variaram entre  $3,92 \pm 0,3$ ;  $7,18 \pm 0,2$ ;  $9,7 \pm 0,3$  e  $10,7 \pm 0,4 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  para os ensaios I, II, III e IV, respectivamente, notando-se que houve redução na  $COV_R$  em 30 e 35% para os ensaios III e IV devido a menor eficiência de remoção de matéria orgânica nesses ensaios.

A Tabela 20 apresenta os melhores resultados de estudos que abordaram o uso de sistemas operados em duas fases que utilizaram resíduos do processamento da mandioca. Verifica-se que elevadas eficiências de remoção de DQO e elevados percentuais de  $\text{CH}_4$  no biogás têm sido obtidos como resultado da separação física entre as fases acidogênica e metanogênica.

**Tabela 20** - Estudos com foco na obtenção de metano a partir de efluentes gerados no processamento da mandioca em sistemas de duas fases.

Reator	COV (gDQOL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TDH (h)	Temp. (°C)	pH	EDQO %	Metabólitos Residuais totais (mgHAc L <sup>-1</sup> )	Relação HAc/HPr	MY <sub>A</sub>	Referência
UASB	15	-	55	-	72	> 700 HAc > 300; HPr >150	2,0	164 mL g <sup>-1</sup> DQO	Intanoo et al. (2014)
UASB	8	-	37	-	93	> 460	2,8	115 L kg <sup>-1</sup> DQO	Intanoo et al. (2016)
UASB	15	-	37	-	40	> 1800 HAc >1000	2,2	325 mL g <sup>-1</sup> DQO	Jiraprasertwong et al. (2019)
UASB	13,4*	12	55	-	76	> 660 HAc > 400	2,1	100 mL g <sup>-1</sup> DQO	Chavadej et al. (2019)
AnSBBR	12	6	30	7,0	60	> 1500	-	263 mL g <sup>-1</sup> DQO	Mari et al. (2020)
ASBR	0,075*	600	-	7,0	10	-	-	100 mL g <sup>-1</sup> DQO	Ismail et al. (2021)
AnSBBR	16	6	35	7,0	67	> 1180 HAc > 700	0,08	270 mL g <sup>-1</sup> DQO	Esse trabalho

%CH<sub>4</sub> – teor de metano no biogás; EDQO – eficiência de remoção de DQO; MY<sub>A</sub> – rendimento de metano por carga aplicada; \*Com adição de resíduos do processamento da mandioca.

Mari et al. (2020) utilizaram um AnSBBR alimentado com efluente de fecularia de mandioca previamente acidificado e obtiveram eficiências de remoção de DQO de 92% para a COV de 5,5 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (TC de 12 h). Chavadej et al. (2019), avaliaram a codigestão da ARFM e bagaço de mandioca em um sistema contínuo de duas fases. Os autores obtiveram 95% de eficiência de remoção de matéria orgânica e obtenção de até 70,5% de metano na composição do biogás quando a carga orgânica aplicada foi de 13,4 kgDQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>. Jiraprasertwong et al. (2018) avaliaram um sistema composto por reatores UASB alimentados com ARFM. Os autores verificaram que o aumento da COV de 5 para 18 kgDQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> resultou na queda gradual da eficiência de remoção de matéria orgânica de 92 para 60% devido ao acúmulo de AOV, resultando em concentrações superiores a 1800 mg L<sup>-1</sup> no efluente. Kongkliang et al. (2017) também verificaram decréscimo no consumo da DQO de 72% para 60% com o aumento da COV de 5 para 15 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> devido ao acúmulo de AOV em um sistema operado em duas fases composto por dois ASBR. De forma semelhante, Intanoo et al. (2014) também obtiveram limitações na remoção de DQO em cargas superiores a 15 kgDQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> em reatores UASB operados em duas fases. De acordo com os autores, nessas condições, 350 mg L<sup>-1</sup> de AOV foram suficientes para causar um efeito tóxico sobre as arqueas metanogênicas, reduzindo a eficiência de remoção de DQO para menos de 70%.

Em sistemas anaeróbios operados em duas fases, a remoção de matéria orgânica tende a ser elevada, pois o metabolismo dos microrganismos acidogênicos e metanogênicos é favorecido, a menos que a concentração de ácidos provoque inibição desses microrganismos (VOLPINI et al., 2018; JIANG et al., 2018). Observa-se, nos estudos listados na Tabela 20, que a carga orgânica aplicada de aproximadamente 15 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> foi limitante para parte dos estudos (INTANOO et al., 2014; KONGKLIANG et al., 2015; JIRAPRASERTWONG et al., 2018), principalmente devido ao aumento na concentração de ácidos orgânicos no reator. É importante mencionar que nos estudos citados anteriormente a biomassa não foi imobilizada e, nesse contexto, destaca-se a estratégia da imobilização celular, que possibilita o aumento do tempo de retenção celular e melhora o desempenho do reator tanto no consumo de matéria orgânica, quanto na produção de metano e biogás (FUESS et al., 2017b), conforme verificado na pesquisa de Mari et al. (2020) e no presente estudo.

### 5.3.3 Desempenho do AnSBBR em relação à produção de metano e biogás

Verificou-se que a redução do tempo de ciclo de 24 h para 6 h e aumento da COV de 4,0 para 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> proporcionou aumento da produção volumétrica e do rendimento de metano (Tabela 21), devido ao aumento na disponibilidade de substrato aos microrganismos.

**Tabela 21** - Desempenho do reator AnSBBR em relação à produção de metano.

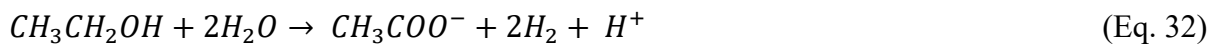
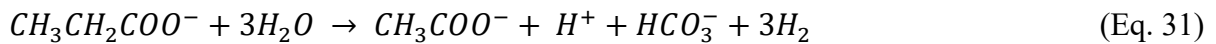
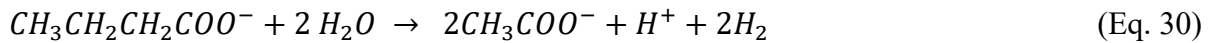
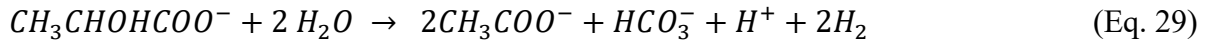
Parâmetros	Ensaio			
	I	II	III	IV
COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	4,0	8,0	12,0	16,0
Qmm (mmolCH <sub>4</sub> d <sup>-1</sup> )	101±27 <b>135</b>	114±22 <b>157</b>	281±51 <b>310</b>	391±63 <b>497</b>
Teor de CH <sub>4</sub> no biogás (%)	73±3 <b>76</b>	74±3 <b>78</b>	69±7 <b>73</b>	65±6 <b>69</b>
PVM (LCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0,677±0,2 <b>0,792</b>	1,48±0,4 <b>1,57</b>	2,31±0,81 <b>2,71</b>	3,74±0,72 <b>3,94</b>
MY <sub>A</sub> (LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup> )	0,154±0,08 <b>0,204</b>	0,182±0,03 <b>0,199</b>	0,199±0,08 <b>0,220</b>	0,270±0,05 <b>0,285</b>
MY <sub>R</sub> (LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup> )	0,151±0,01 <b>0,175</b>	0,178±0,06 <b>0,188</b>	0,179±0,03 <b>0,197</b>	0,253±0,08 <b>0,277</b>
TPE (kJ L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	24,37±3,2	53,28±4,1	83,16±8,1	134,6±7,1

\*Valores corrigidos para condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Os valores máximos estão representados em negrito. Qmm – Vazão molar de metano; MY<sub>A</sub>– Rendimento de metano em função da carga orgânica aplicada; MY<sub>R</sub>– Rendimento de metano em função carga orgânica removida; TPE – Taxa de produção energética.

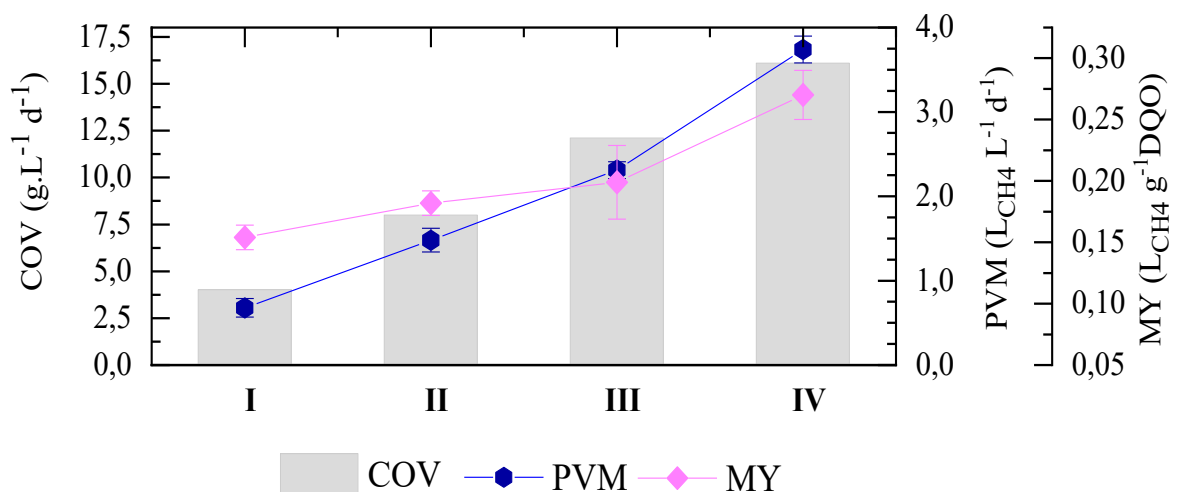
De maneira geral, o teor médio de metano no biogás foi de 70%. O ensaio I (COV de 4,0 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) apresentou percentual médio de 73% de metano no biogás, com produção volumétrica de 0,677±0,2 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e rendimento de 0,154±0,08 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>, enquanto no ensaio II (COV de 8,0 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) o teor médio de metano aumentou para 74%, chegando ao máximo de 78%, enquanto a produção praticamente dobrou (1,48±0,4 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), indicando que o aumento da COV e a redução do tempo de ciclo de 24 h para 12 h favoreceram a produção de metano. De acordo com a literatura é possível obter concentrações de metano no biogás acima de 70% em sistemas operados em duas fases, devido aos ácidos orgânicos estarem facilmente disponíveis no substrato (SÁNCHEZ et al., 2005; LULLIO et al., 2014; VOLPINI et al., 2018).

O aumento da COV e a diminuição do tempo de ciclo proporcionaram aumento gradual da produção volumétrica. No ensaio III (COV de 12 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) a produção foi de 2,31±0,81 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, enquanto no ensaio IV (COV de 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) aumentou para 3,74±0,72 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. Em contrapartida, foi verificada redução do teor de metano no biogás nesses dois ensaios, com percentual médio de 69% e 65%, respectivamente, seguido do incremento na proporção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no biogás. O aumento de CO<sub>2</sub> no biogás está relacionado ao aumento na concentração de ácidos no reator metanogênico (MARI et al., 2020; RAMOS e SILVA, 2020). Conforme mencionado anteriormente, a redução gradativa do tempo

de ciclo dos ensaios I ao IV reduziu o tempo hábil para a conversão dos AOV em metano, resultando em maior concentração de ácidos no efluente e de dióxido de carbono no biogás. As equações 29 a 32 representam a conversão dos ácidos láctico, butírico, propiônico e do etanol, em ácido acético, respectivamente.



Comportamento semelhante ao da produção volumétrica foi observada para o rendimento de metano nos ensaios I ao IV (Figura 21). Nota-se nos ensaios III e IV que com o aumento da COV de 12 para 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> o rendimento por carga removida aumentou de 0,179 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup> para 0,253 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>, respectivamente, apresentando rendimento máximo de 0,277 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup> no ensaio IV. Elevados rendimentos de metano relacionados à aplicação de elevadas cargas orgânicas em tempos de ciclo reduzidos estão associados a separação do sistema em duas fases, devido a pronta disponibilização de acetato à biomassa metanogênica (FUESS, 2017). Resultados semelhantes foram observados por Mari et al. (2020) e Araújo et al. (2018) que em reatores alimentados com ARFM obtiveram rendimentos de 0,263 e 0,220 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup> para as cargas orgânicas de 12 e 10 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 21** - Produção volumétrica e rendimento de metano por carga removida.

A partir da produção volumétrica de metano, foi estimada a eficiência energética em cada condição experimental. A taxa de produção energética (TPE) dos ensaios I, II, III e IV foi

de 24,37; 53,28; 83,16 e 134,6 kJ L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente. O aumento da COV para 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e a diminuição do TC para 6 h resultaram nos maiores valores de produção volumétrica e TPE de 3,94 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 141 kJ L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectivamente. A Tabela 22 apresenta as TPEs médias obtidas a partir de diferentes estudos considerando a produção de metano em sistemas de uma e de duas fases.

**Tabela 22** - Comparativo entre pesquisas quanto à produção energética a partir de efluente de fecularia de mandioca.

Sistema	Reator	TDH CH <sub>4</sub> (h)	COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	PVM (LCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	PVH (LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TPE Total (kJ L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Referência
UF	AFBR	-	5,6	0,75	-	27	Wattthier et al. (2019)
UF	ARHF	120	8,5	0,54	-	19,4	Palma et al. (2018)
DF	UASB	-	90	0,65	0,53	29,1	Intanoo et al. (2014)
DF	UASB	12	13,4	0,82	0,63	36,32	Chavadej et al. (2019)
DF	AnSBBR	6*	12	2,71	0,7	105,2	Mari et al. (2020)
DF	AnSBBR	6*	16	3,74	1,2	147,6	Esse estudo

UF – sistema de fase única; DF - sistema de duas fases. \*Em TC – Tempo de ciclo.

É possível que o elevado rendimento energético observado neste estudo esteja associado à estabilidade na operação em cargas orgânicas maiores (16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), como também à adição das ramas como material suporte, que foram codigeridas ao longo do processo, assim como foi observado no reator acidogênico. Os resíduos lignocelulósicos apresentam lenta degradabilidade, requerendo maiores tempos de retenção hidráulica nos digestores o que, consequentemente, reduz as taxas de produção de biogás (RASAPOOR et al., 2020, CREMONEZ et al., 2021). Em contrapartida, quando codigeridos com substratos ricos em carboidratos facilmente degradáveis, esses materiais podem equilibrar a DA (NEGI et al., 2018). Observou-se que na rama de mandioca submetida à hidrólise ácida os açúcares presentes no material se tornaram disponíveis aos microrganismos, colaborando para o metabolismo microbiano em ambos reatores.

Além disso, o material continuou sendo degradado ao longo da operação, o que pode ter contribuído para aumentar o rendimento e a produção de metano. Isso porque, além da recuperação energética desses resíduos por meio da geração de biogás, a codigestão de materiais com características complementares, pode proporcionar um efeito sinérgico entre os microrganismos devido à presença de nutrientes na biomassa lignocelulósica (CHANDRA et al., 2012; KAINTHOLA et al., 2019). Yue et al. (2010) sugerem que durante a digestão anaeróbia o consórcio microbiano favorece a quebra da hemicelulose em detrimento a outros polissacarídeos heterogêneos presentes no meio. A degradação da hemicelulose, leva a desestabilização da estrutura recalcitrante, permitindo a solubilização da celulose por enzimas (MACLELLAN et al., 2013; YUE et al., 2010). Dessa forma, a glicose, resultante da hidrólise da hemicelulose, pode servir como substrato para os microrganismos, que posteriormente serão convertidos em ácidos orgânicos e metano (SAWATDEENARUNAT et al., 2015). Nesse contexto, o uso de resíduos lignocelulósicos como cosubstrato suplementa o meio com oligoelementos essenciais como ferro, cobalto, níquel, molibdênio, selênio e tungstênio, aumentando a produção e rendimento de metano e proporcionando estabilidade ao reator (YE et al., 2013, SAWATDEENARUNAT et al., 2015).

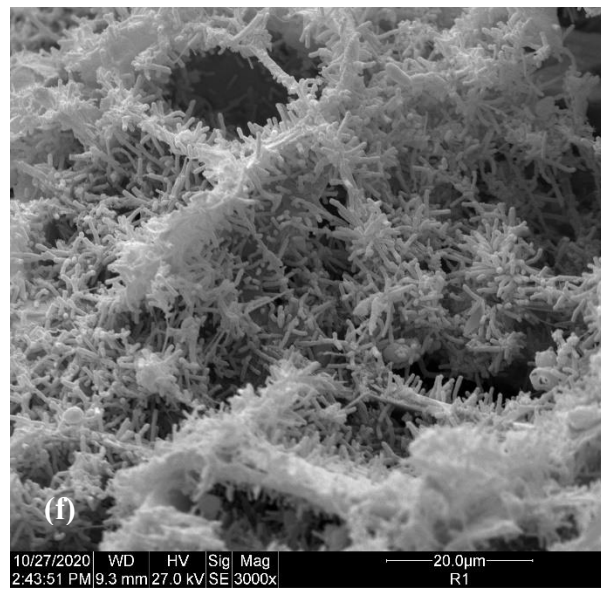
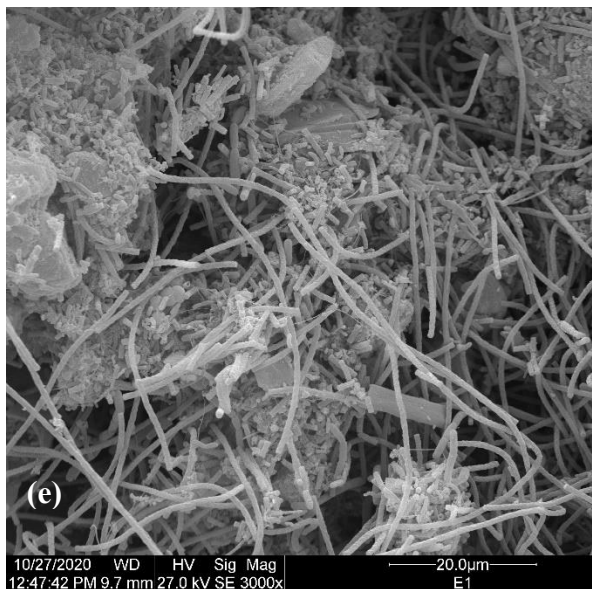
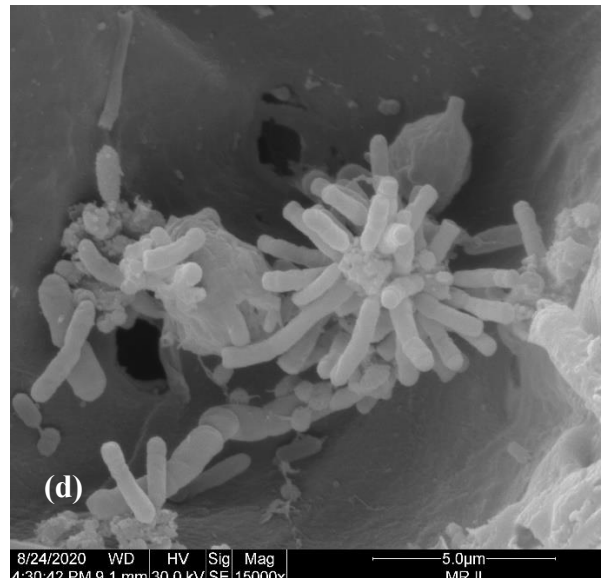
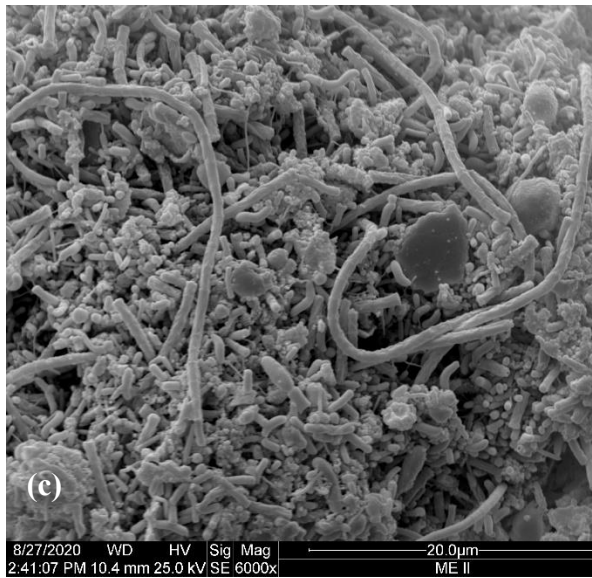
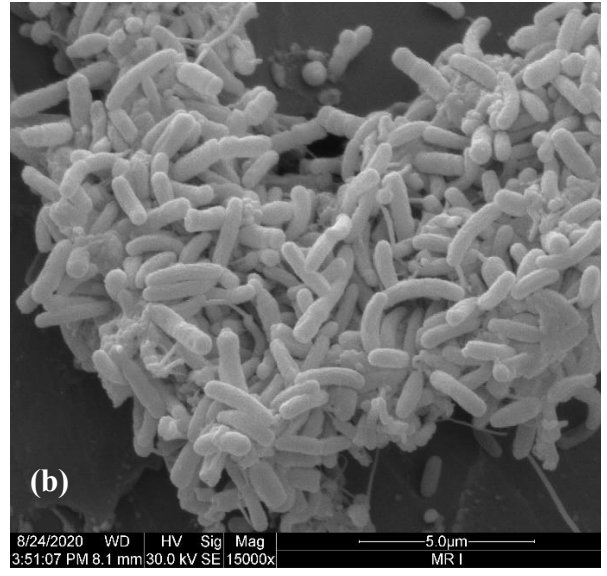
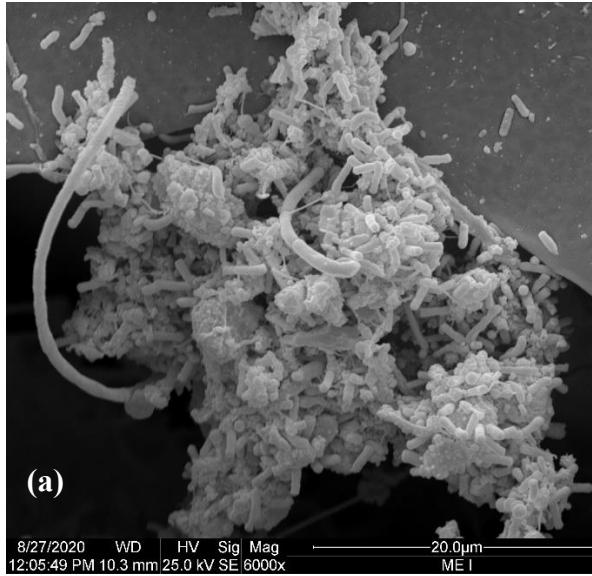
Ao final da operação do reator metanogênico, verificou-se que houve degradação de 25% da celulose, 12% da hemicelulose e 2% da lignina, conforme será discutido posteriormente. Com a adição das ramas, a relação C/N no reator metanogênico manteve-se na faixa entre 70 e 80, sendo que o maior rendimento observado ( $0,270 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$ ) foi verificado em relações C/N de 80, bem acima dos valores recomendados pela literatura, que variam entre 20 e 30 (SÁNCHEZ et al., 2005; WEILAND, 2006; SAWATDEENARUNAT et al., 2015). No entanto, esses valores foram reportados em reatores fase única. Em sistema de duas fases, de forma semelhante ao presente estudo, Chavadej et al. (2019) verificaram que durante a codigestão da ARFM e de resíduos de mandioca ( $1200 \text{ mg L}^{-1}$ ) o rendimento de metano ( $100 \text{ mLCH}_4 \text{ g}^{-1}\text{DQO}$ ) foi favorecido em relações C/N de 85.

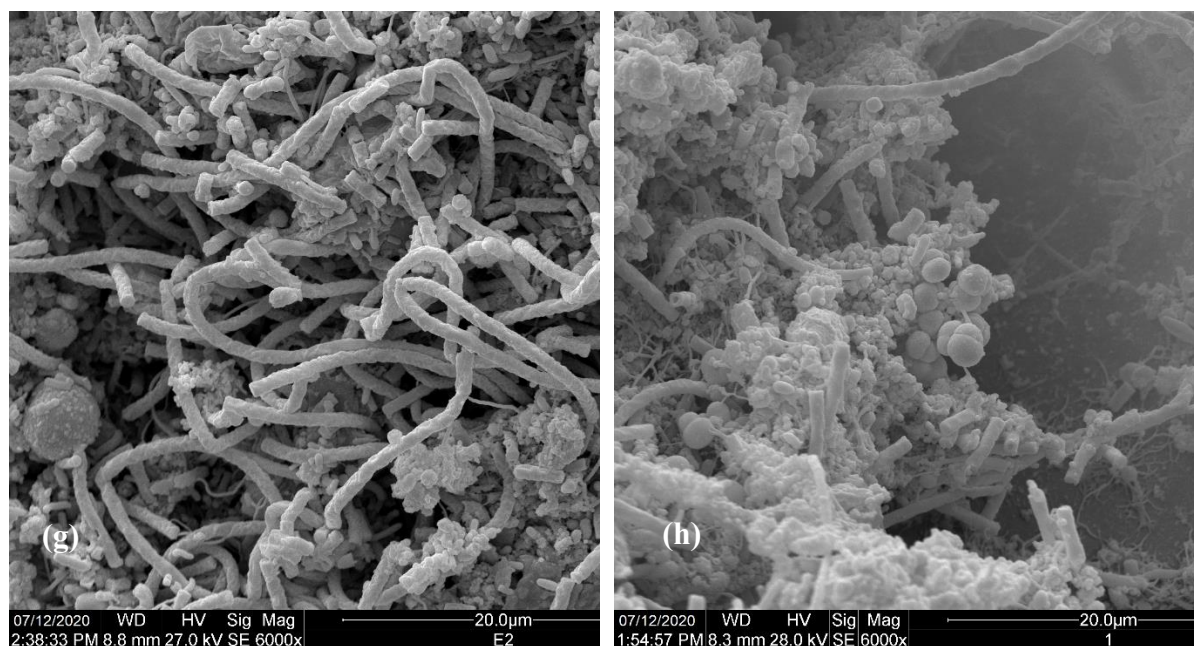
A adição das CS fez com que as concentrações de oligoelementos, macro e micronutrientes aumentassem em até 50% ao longo da operação do sistema de duas fases. Conforme mencionado no item 5.2.3, na ARFM foram observadas concentrações iniciais de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  de  $4,0 \pm 2,1$ ;  $409 \pm 83$ ;  $0,03 \pm 0,01$  e  $0,5 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, em contrapartida, não foi observada a presença de  $\text{Cu}^{2+}$ . No efluente do reator acidogênico, as concentrações médias de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  aumentaram para  $4,9 \pm 1,3$ ;  $521 \pm 58$ ;  $0,1 \pm 0,1$ ;  $0,6 \pm 0,1$  e  $0,09 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. No efluente do reator metanogênico

essas concentrações foram ainda maiores, alcançando  $6,2\pm 3,4$ ;  $684\pm 132$ ;  $0,3\pm 0,1$ ;  $0,7\pm 2,1$  e  $0,2\pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esse aumento na concentração dos metais traço pode ter contribuído para a produção de metano, pois Fe<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> são elementos requeridos na catálise enzimática, no transporte de moléculas, na estrutura proteica e no controle de pressão osmótica nas células dos microrganismos metanogênicos (GERARDI et al., 2003), possibilitando o crescimento microbiano. Não há consenso na literatura quanto a concentrações ideais de elementos traço na DA. Banks et al. (2012) em um digestor utilizado no tratamento de resíduo alimentar (COV de 3,0 kgSV L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) verificaram que a suplementação do substrato com elementos como Co (1,0 mg L<sup>-1</sup>), Fe (5,0 mg L<sup>-1</sup>), Mo (0,2 mg L<sup>-1</sup>), Ni (1,0 mg L<sup>-1</sup>), Se (0,2 mg L<sup>-1</sup>) e Zn (0,2 mg L<sup>-1</sup>) ocasionou aumento da produção volumétrica de biogás de 1,5 para 3,75 m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>. Palma et al. (2018) operando um reator anaeróbio de leito fixo alimentado com ARFM, verificaram que a produção máxima de metano de 0,54 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> foi obtida com a aplicação da COV de 8,5 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e em concentrações de K<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, de aproximadamente 600; 6,5; 0,35; 0,15; 0,3; 0,6 mg L<sup>-1</sup>. Embora não sejam reportadas faixas ideais desses elementos para a metanogênese, verificou-se no presente estudo que as concentrações observadas não foram tóxicas aos microrganismos, uma vez que não houve inibição na produção de metano.

#### 5.3.4 Desempenho do AnSBBR metanogênico em relação à retenção celular

O reator acidogênico operado na faixa de pH de 5,0 a 6,0 altera as características bioquímicas de compostos presentes no substrato, possibilitando a desnaturação de proteínas e a quebra das ligações glicosídicas dos carboidratos, deformando sua estrutura terciária e deixando os polímeros biodegradáveis expostos à hidrólise (SHENG et al., 2010; MASPOLIM et al., 2015). Além disso, a manutenção das condições ideais como tempo de ciclo (4 h) e faixa de pH (6,0) para o consórcio microbiano da acidogênese, assim como o pH de 7,0 e tempos de ciclos mais longos (24 h – 6 h) da metanogênese, favoreceu a ação metabólica dos respectivos grupos, uma vez que, a taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{max}$ ) das bactérias acidogênicas é de 5,1 d<sup>-1</sup>, enquanto das bactérias metanogênicas é de 0,6 d<sup>-1</sup> (ANGELIDAKI et al., 2005). A Figura 22 apresenta as principais estruturas microbianas verificadas por microscopia eletrônica de varredura. São observadas, principalmente, bacilos curvos e cocos, além de estruturas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp, como estruturas filamentosas e estruturas de cocos aglomerados respectivamente.





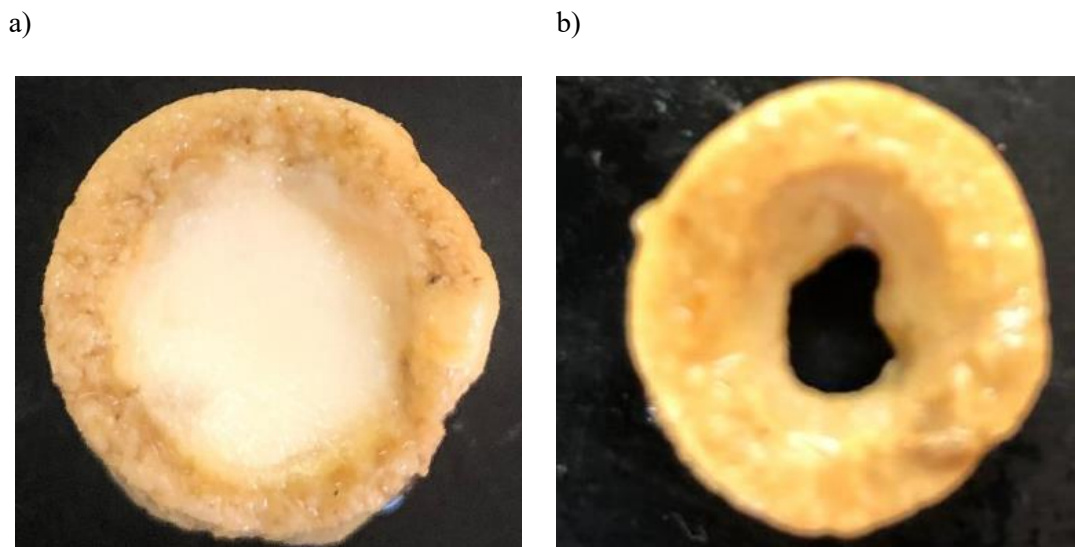
**Figura 22** - MEV do biofilme metanogênico: a) e b) Ensaio I (estruturas semelhantes a bacilos e *Methanosaeta*); c) e d) Ensaio II (estruturas semelhantes a bacilos e *Methanosaeta*); e) e f) ensaio III (estruturas semelhantes a *Methanosaeta* e bacilos); g) e h) ensaio IV (estruturas semelhantes a *Methanosaeta* e *Methanosarcina*).

A partir das estruturas observadas, é possível inferir que no reator metanogênico a comunidade microbiológica apresentou estruturas semelhantes a arqueas acetoclásticas pertencentes aos gêneros *Methanosaeta* (estruturas filamentosas) e *Methanosarcina* (estruturas arredondadas), enquanto as estruturas semelhantes a bacilos podem ser associadas a presença de arqueas hidrogenotróficas como a *Methanobacterium*, *Methanopyrus* e *Methanobrevibacter* (MEUER et al., 2002; GERARD et al., 2003; MASPOLIM et al., 2015). Conforme houve incremento da COV, a predominância desses grupos pode ter se alterado no reator metanogênico, uma vez que, observou-se a presença de estruturas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e arqueas hidrogenotróficas nos ensaios I, II e III, e estruturas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e *Methanosarcina* sp. no ensaio IV, no qual houve aumento da concentração de metabólitos no efluente para 1571 mgDQO L<sup>-1</sup> e redução de pH para 7,8. O gênero *Methanosaeta* sp. cresce em faixas de pH entre 6,5 e 8,5, enquanto *Methanosarcina* sp. cresce em valores de pH que variam de 5,0 a 8,0, conseguindo sobreviver mesmo com concentrações de acetato de até 14,75 g L<sup>-1</sup> (De VRIEZE et al., 2012, MASPOLIM et al., 2015).

Nos três primeiros ensaios, predominaram estruturas semelhantes às arqueas hidrogenotróficas e acetoclásticas (Figura 22). Durante a via hidrogenotrófica ocorre redução do CO<sub>2</sub>, no qual o H<sub>2</sub> é doador de elétrons, sendo a metanoptertina e a coenzima F420 as coenzimas-chave do processo (GRAHAN e WHITE, 2002; MEUER et al., 2002). Como o

reator metanogênico foi alimentado com o efluente do reator acidogênico, é possível que houvesse  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  dissolvidos no substrato, o que pode ter favorecido as vias hidrogenotrófica e acetoclástica. Com o aumento gradativo da COV, é possível que a via acetoclástica tenha sido favorecida, devido à maior concentração de metabólitos solúveis no reator (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2016). Nessas condições, microrganismos como *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, convertem o acetato em metano e  $\text{CO}_2$  utilizando a coenzima M e coenzima B como cofatores (GRAHAM e WHITE, 2002; MEUER et al., 2002). Gonzalez-Martinez et al. (2016) verificaram comportamento semelhante ao estudar um sistema anaeróbio operado em duas fases alimentado com lodo de esgoto. Os autores identificaram uma mudança na comunidade microbiana da fase inicial (com abundância de metanogênicas hidrogenotróficas como *Methanocorpusculum*; *Methanobacterium*; *Methanomassiliicoccaceae* e *Methanoculleus*) em condições de relação AV/AT de aproximadamente 0,063 sendo alterada para *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*, após alteração na relação AV/AT para 0,208, com aumento na concentração AOV, provocando dominância das metanogênicas acetotróficas.

A relação biomassa/meio suporte nos ensaios I a IV manteve-se entre 0,2 a 0,23  $\text{g}^{-1}\text{SVT g}^{-1}$  suporte, notando-se um breve incremento com o aumento da COV. Ao longo do processo a CS foi codigerida, perdendo parte de sua estrutura física (Figura 23 e Tabela 23).



**Figura 23** - Estrutura da CS no início (a) e ao término (b) do período operacional metanogênico.

**Tabela 23** – Degradação da rama de mandioca ao longo do experimento metanogênico.

	Degradação da estrutura lignocelulósica			Proteína (mg g <sup>-1</sup> )
	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	
CS <i>in natura</i>	-	-	-	1,8
I	-	8	3	3,6
II	1	11	5	5,8
III	2	20	8	8,5
IV	2	25	12	12,3

Observou-se que a degradação da celulose ao longo da operação do reator metanogênico (ensaio IV, 25%) foi inferior a obtida no reator acidogênico (ensaio II, 36%). A matéria orgânica presente no afluente do reator metanogênico, é composta principalmente por AOV, que podem ser metabolizados de forma mais eficiente pelas arqueas metanogênicas do que a celulose por outros organismos, o que pode ter contribuído para que a degradação das CS fosse menor no reator metanogênico. Chavadej et al. (2019) também observaram que os resíduos de mandioca adicionados ao reator metanogênico apresentaram menor digestibilidade (23%) quando comparado ao reator acidogênico (41%), devido à variação da comunidade microbiana entre os reatores.

A concentração de proteínas na rama ao final do ensaio IV (12,3 mg g<sup>-1</sup>) também foi menor do que a concentração obtida no RA (34,2 mg g<sup>-1</sup>). Conforme discutido anteriormente, o teor de proteína em materiais lignocelulósicos utilizados na imobilização celular corresponde aos microrganismos aderidos ao material (LIU et al., 2020). É possível que a imobilização mista (CS e espuma de poliuretano) tenha favorecido maior adesão dos microrganismos na espuma, que apresenta elevada porosidade (95%), embora a concentração de proteína da rama tenha aumentado mais de dez vezes ao final da operação do reator. Além disso, nos ensaios I, II, III e IV, foram verificadas concentrações de polissacarídeos totais (PLT) no material suporte de 64,2±12,3; 73,4±31,3; 97,21±32,2 e 105,38 ± 12,2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O aumento da PLT está relacionado ao aumento da COV, pois o incremento da carga orgânica tende a aumentar a espessura do biofilme em reatores com biomassa aderida (ZHANG et al., 2014; BASSIN et al., 2016).

Portanto, mesmo com a degradação parcial da estrutura da rama, a imobilização mista no reator metanogênico evitou o *washout* dos microrganismos e perda de eficiência do reator ao longo da operação, sobretudo com a aplicação de cargas orgânicas elevadas ( $16 \text{ gCOV L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e tempos de ciclo reduzidos (6 h), uma vez que, as principais causas do arraste da biomassa em reatores anaeróbios operados em bateladas estão relacionadas a sobrecarga orgânica e estresse metabólico, como a presença de compostos tóxicos e inibitórios (RATUZNEI et al, 2001; CREMONEZ et al., 2021).

### 5.3.5 Considerações finais da Fase III

A adição das ramas como material suporte e a separação do sistema em duas fases proporcionaram produção e rendimento de metano de  $3,74 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $0,270 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$  para a maior carga orgânica volumétrica aplicada ( $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e o menor tempo de ciclo (6 h) testados. No entanto, o incremento de matéria orgânica aliado à redução do tempo hábil para o metabolismo e crescimento dos microrganismos, provocaram aumento na concentração de metabólitos no efluente ( $1541 \text{ mg L}^{-1}$ ), o que reduziu a eficiência de remoção de matéria orgânica de 90% (ensaio II) para 67% (ensaio IV). Apesar do aumento na concentração de ácidos orgânicos e etanol, o reator metanogênico manteve sua estabilidade operacional, com alcalinidade entre  $5189 - 3000 \text{ mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$  e relações AV/AT e AI/AP de até 0,20 e 0,33. As ramas de mandioca foram codigeridas ao longo do experimento, resultando na degradação de 25% da estrutura celulósica ao final do ensaio IV, e aumento de aproximadamente 20% na concentração de nutrientes, metais e oligoelementos, o que pode ter contribuído para a elevada produção de metano.

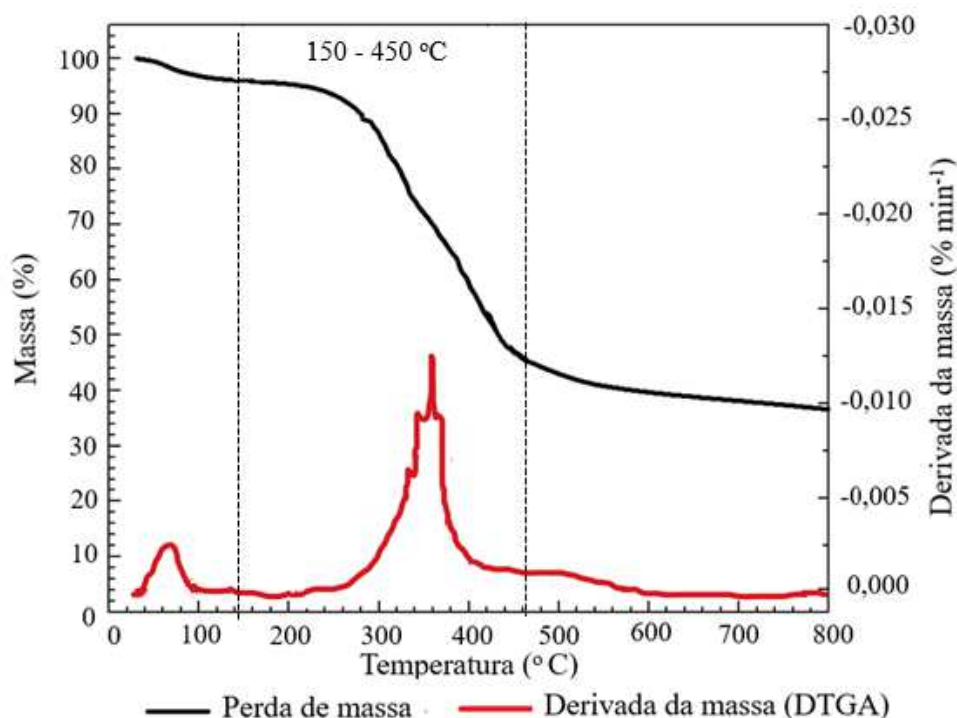
## 5.4 FASE IV - ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE METANO COM ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSAGENS DE BIOCARVÃO

Na Fase IV foi realizada a produção e caracterização do biocarvão em conjunto com testes para avaliar a influência da adição de diferentes dosagens sobre a produção de metano. O BC foi produzido a partir do lodo e do material de imobilização do reator acidogênico, coletados ao final da operação do reator, como forma de promover uma destinação final ambientalmente adequada para este material e produzir um subproduto passível de reaproveitamento e capaz de aumentar a produção de metano, o biocarvão.

### 5.4.1 Caracterização do biocarvão

#### a) Análise termogravimétrica (TGA) e estimativa de rendimento do biocarvão

A Figura 24 apresenta a análise de TGA da matéria-prima utilizada para produção do biocarvão (lodo e material de imobilização do reator acidogênico).



**Figura 24** – Análise Termogravimétrica do lodo e do material de imobilização do reator acidogênico.

A análise de TGA demonstrou 3 principais níveis de conversão do material: i) a desidratação; ii) a perda de compostos orgânicos voláteis; e iii) a carbonização. Inicialmente, entre 150 - 300 °C, ocorreu a desidratação do material, enquanto na faixa de 300 – 450 °C, houve a perda de compostos orgânicos voláteis, com picos nas temperaturas em 334; 354 e 365 °C, devido à combustão dos compostos orgânicos presentes na estrutura lignocelulósica da rama de mandioca (FOONG et al., 2020). A hemicelulose e a celulose se decompõem entre as temperaturas de 180 - 285 °C e 285 - 365 °C, respectivamente (TZVETKOV et al., 2016). A lignina, devido à complexa estrutura da unidade de n-propilbenzeno, relacionada às múltiplas ligações éter e carbono-carbono que a compõem (NEUTELINGS, 2011; FERRARA, et al., 2014), tem maior estabilidade térmica e se decompõe em temperaturas mais elevadas, entre 365 e 500 °C (FOONG et al., 2020). A derivada da curva de perda de massa (DTGA) demonstra que a taxa máxima de decomposição do material ocorreu entre 200 e 450 °C, com maior liberação da matéria volátil e gases. Este resultado é consistente com o resultado relatado por Pattiya (2012) e Foong et al. (2020), que constataram a degradação da estrutura da CS na faixa

de temperatura de 250 - 450 °C. Por fim, o terceiro evento ocorreu acima da temperatura de 450 °C, com a carbonização do material. Após a temperatura de 600 °C houve a estabilização da perda de massa, indicando que essa seria a temperatura mínima de pirólise do material. Ao final do processo de pirólise, o teor de carbono fixo e cinzas representou aproximadamente 45% do total de massa.

Com objetivo de obter um biocarvão estável, considerando a faixa de temperatura de degradação de matéria orgânica e inorgânica obtida pela análise termogravimétrica, a temperatura de pirólise escolhida foi de 800 °C, na qual o rendimento do BC foi de 62%. De acordo com Shen et al. (2020), quanto maior o tempo e a temperatura de pirólise menor será o rendimento do BC devido à queima e decomposição das estruturas da matéria-prima. Além de influenciar no rendimento do biocarvão, a temperatura de pirólise influencia na estrutura da superfície, na composição e nas propriedades do BC (CODIGNOLE LUZ et al., 2019). Para a pirólise realizada na faixa de 700 a 800 °C, os grupos funcionais ácidos, que contém oxigênio, se decompõem em CO<sub>2</sub> ou CO para serem gradualmente removidos, enquanto alcanos, como metil (-CH<sub>3</sub>) e metileno (-CH<sub>2</sub>), desaparecem, porém, a estrutura do anel aromático, o teor de carbonização e o grau de aromatização aumentam (McBEATH et al., 2011; YOU et al., 2017). Essas alterações elevam a estabilidade aromática do BC e são essenciais para manutenção da alcalinidade do material, características benéficas para seu uso na digestão anaeróbia (McBEATH et al., 2011; QI et al., 2021). Além disso, essa faixa de temperatura aumenta o grau de grafitação e a condutividade elétrica do material (SAJJADI et al., 2018; CODIGNOLE LUZ et al., 2019).

#### b) Análise elementar do biocarvão

A Tabela 24 contém os resultados da análise elementar da rama de mandioca e do biocarvão, indicando que o principal componente da CS e do BC é o carbono (42,8 e 58,55% em massa). Os percentuais de K (0,42) e P (1,62) do BC, em conjunto com sua aromatização, favorecem a alcalinidade desse material (INDREN et al., 2020). Os baixos teores de H e N, aliados às baixas razões H/C (0,02) e O/C (0,30), demonstram a estabilidade do biocarvão e estão relacionadas as reações de desidratação e descarboxilação de grupos funcionais como hidroxila, carboxila e carbonila (YOU et al., 2017). Essas reações, aliadas ao elevado teor de C, indicam aumento do nível de carbonização no biocarvão (QI et al., 2021), contribuindo para aumentar sua aromaticidade e reduzir a resistência à transferência de elétrons, o que é essencial para a doação de elétrons interespecies (DIET) na digestão anaeróbia (SUN et al., 2017; YOU et al., 2017).

**Tabela 24** – Análise da composição elementar da rama de mandioca e do biocarvão.

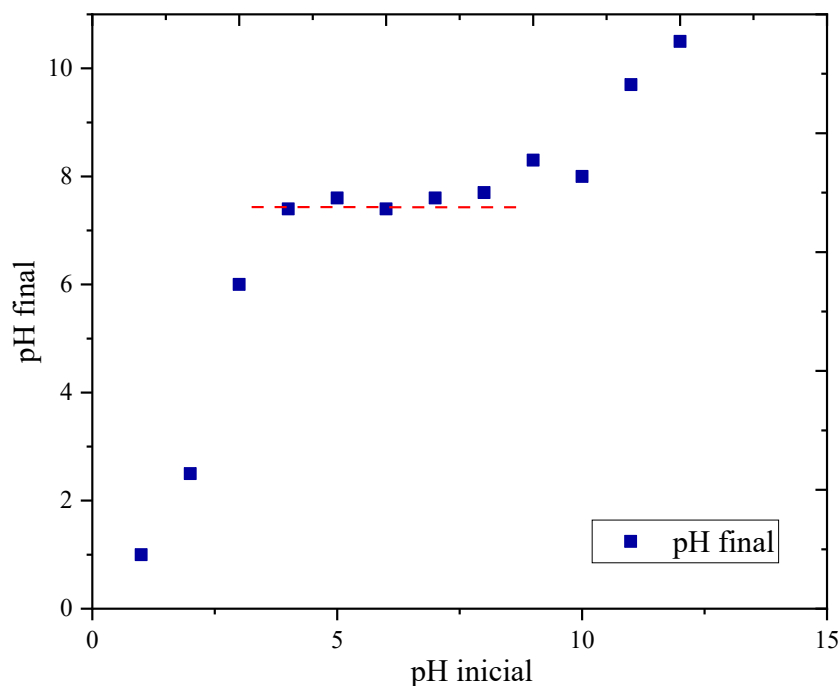
Composição	Rama de Mandioca	Biocarvão
C (% em massa)	42,8	58,55
H (% em massa)	5,90	0,90
N (% em massa)	0,21	0,12
O (% em massa)	38,3	20,43
K (% em massa)	0,45	0,42
P (% em massa)	1,68	1,62
H/C	0,15	0,02
O/C	0,92	0,30

C - Carbono; H – Hidrogênio; N – Nitrogênio; O – Oxigênio; K – Potássio; P – Fósforo. Não foi detectado enxofre em nenhuma das amostras.

A partir dos teores de C, H e O foi obtido o potencial calorífico (PC) do biocarvão de aproximadamente 20,14 MJ kg<sup>-1</sup>, indicando potencial energético semelhante ao do carvão vegetal, cujo PC é de 24,80 MJ kg<sup>-1</sup> (WIJITKOSUM e SRIBURI, 2021).

#### c) pH, condutividade e ponto isoelétrico

O pH do biocarvão apresentou-se alcalino, na faixa de 8,5±0,2, resultado do processo de quebra dos grupos funcionais ácidos e aumento dos metais alcalinos em sua composição (YOU et al., 2017; WIJITKOSUM e SRIBURI, 2021). O ponto isoelétrico foi de 7,6 (Figura 25), e situa-se dentro de uma ampla faixa (5,8 – 8,9) contemplada pela literatura para BCs não ativados e produzidos em temperaturas superiores a 600 °C (MENENDEZ et al., 1995; HOSSAIN et al., 2011; LI et al., 2013). De acordo com Hossain et al. (2011), os BCs não ativados resultantes da mistura de materiais lignocelulósicos e produzidos em elevadas temperaturas (acima de 600 °C), apresentam tendência de ponto isoelétrico entre neutro a alcalino. O valor do ponto isoelétrico acima de 7,0 indica que a superfície do biocarvão é carregada positivamente (LI et al., 2013) e, portanto, a faixa adequada para realizar os ensaios de adsorção é abaixo de 7,6.



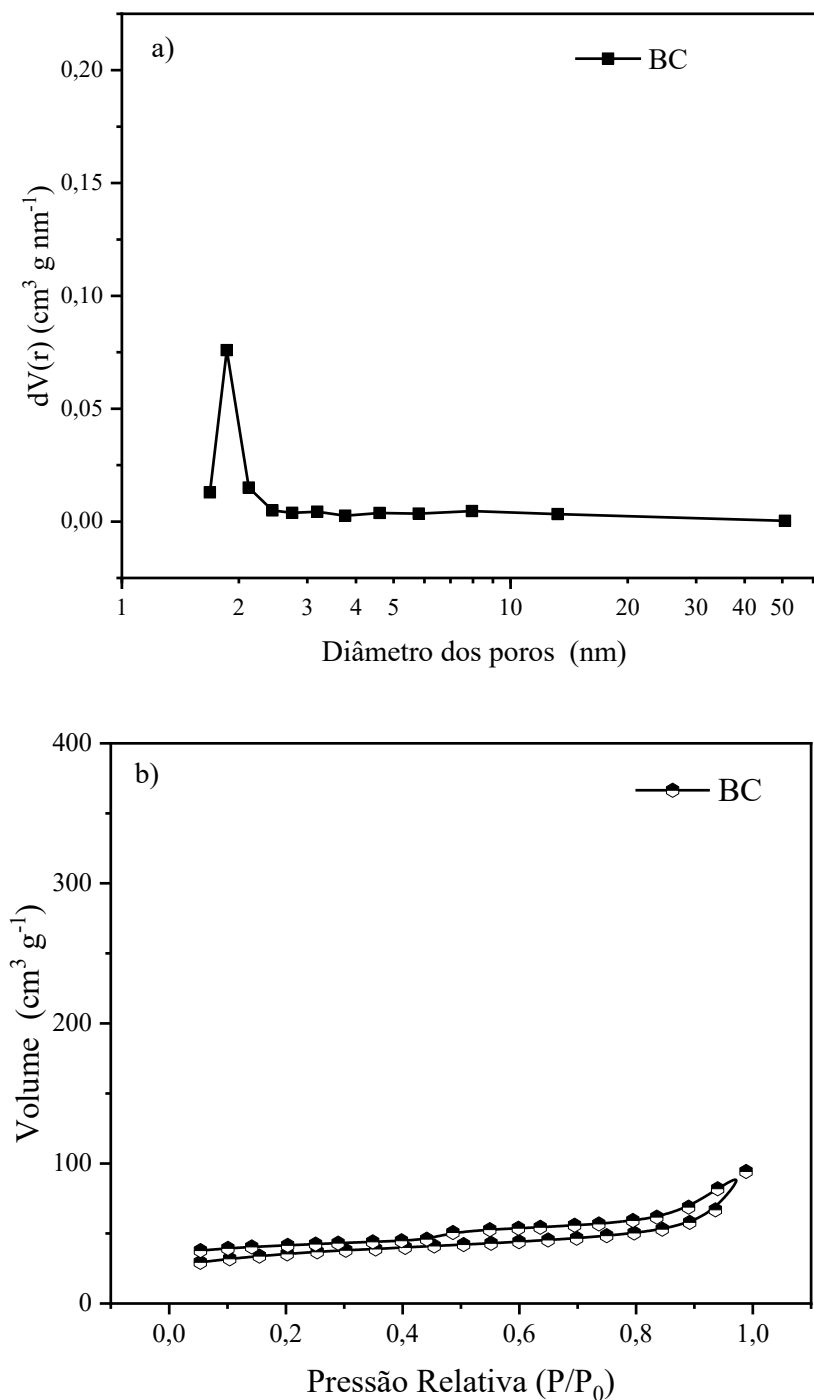
**Figura 25** - Ponto isoelétrico do biocarvão (a linha tracejada em vermelho indica os valores médios do pH que tendem a um mesmo valor, obtendo-se o ponto isoelétrico).

A condutividade elétrica do BC foi de  $1,02 \pm 0,02 \text{ dS m}^{-1}$ . Devido as suas características condutoras, o biocarvão atua como um “transportador de elétrons” (CHEN et al., 2014; ZHAO et al., 2015; SHEN et al., 2017) ou como um “eletrodo” (SHANMUGAM et al., 2018) que facilita a transferência direta de elétrons entre bactérias acetogênicas, que agem como “redutores anódicos”, e arqueas metanogênicas, que agem como “oxidantes catódicos” (CHEN et al., 2014; ZHAO et al., 2015; SHEN et al., 2017). A condutividade de  $1,02 \pm 0,02 \text{ dS m}^{-1}$  está acima da faixa considerada na literatura ( $0,3 \text{ dS m}^{-1}$ ) como valor mínimo para promover a DIET na digestão anaeróbia (CHEN et al., 2014b). Wijitikosum e Sriburi (2021) obtiveram condutividade de  $1,35 \text{ dS m}^{-1}$  para biocarvão produzido em temperatura de  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  utilizando a rama de mandioca como matéria-prima. A rama de mandioca deste estudo apresentou condutividade de  $1,12 \text{ dS m}^{-1}$ . A menor condutividade elétrica do biocarvão em comparação à da rama de mandioca pode estar relacionada à matéria-prima do BC (CS + lodo acidogênico), uma vez que a condutividade de biocarvões produzidos a partir de lodos anaeróbios está situada em uma faixa inferior, entre  $0,25 - 0,35 \text{ dS m}^{-1}$  (HO et al., 2017; JANG et al., 2017).

### c) Análise textural e área específica

Observa-se na curva de distribuição de poros (Figura 26a), que a maior parte da adsorção das moléculas de  $\text{N}_2$  ocorreu em diâmetros de poros inferior a  $2 \text{ nm}$ , o que caracteriza o biocarvão como microporoso. Verificou-se que a área dos microporos foi de aproximadamente

$76,8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , com volume total de poros ( $V_T$ ) e volume de microporos de ( $V_\mu$ ) de  $0,10$  e  $0,04 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente, compondo uma estrutura formada por  $37,2\%$  de microporos e  $62,8\%$  de mesoporos.



**Figura 26** - a) Curva de distribuição dos poros do BC; b) Isotermas de adsorção e dessorção de  $\text{N}_2$  do BC.

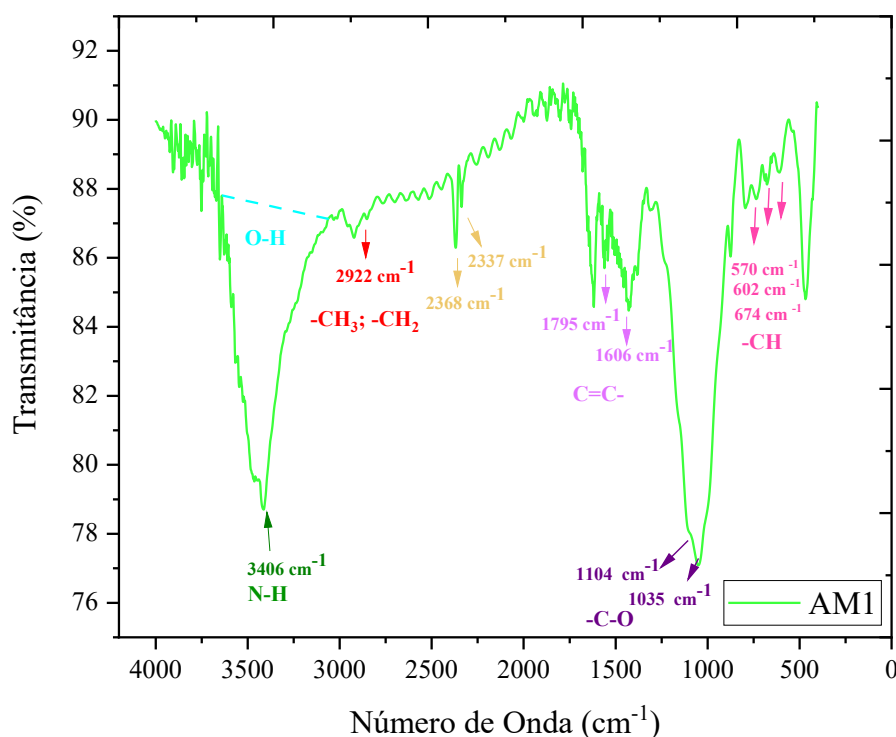
A partir das isotermas de adsorção e dessorção de  $\text{N}_2$  (Figura 26b) obteve-se a área de superfície específica ( $S_{\text{BET}}$ ) de  $123,7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  para o biocarvão. Comumente, os BCs sem ativação

apresentam menor área específica e volume de poros do que os BCs ativados, que possuem maior capacidade de adsorção (PARK et al., 2019; MASEBINU et al., 2019).

A área superficial e o volume de poros variam conforme a origem (matéria-prima), temperatura de pirólise e condições de ativação, ou não, do BC. Para biocarvões ativados são reportados valores elevados de área superficial ( $> 700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) e volume total de poros ( $> 0,50 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ), assegurando uma capacidade superior de adsorção quando comparada ao BC sem ativação (SHEN et al., 2015; CHA et al., 2016; TAN et al., 2016; TAN et al., 2017; FAGBOHUNGBE et al., 2017; KWAK et al., 2019). Embora apresente área e volume de poros menores, o BC sem ativação, como precursor da DIET na digestão anaeróbia, apresenta maiores vantagens, como menor custo de produção (não precisa ser submetido a novos processos térmicos e químicos); capacidade de imobilização celular e menor adsorção de matéria orgânica e metano (FAGBOHUNGBE et al., 2017; UZI et al., 2019; WANG et al., 2021).

#### d) Análise dos grupos funcionais do biocarvão

Os grupos funcionais identificados a partir da análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) estão apresentados na Figura 27.



**Figura 27** – Análise dos grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) do biocarvão;

O biocarvão possui três grupos funcionais principais que podem afetar o desempenho da digestão anaeróbia: alifáticos, oxigenados e aromáticos (XUE et al., 2015). Na estrutura do biocarvão, os principais alongamentos foram observados nas bandas entre 3500 - 3300  $\text{cm}^{-1}$  e 1035 - 1100  $\text{cm}^{-1}$ , associados à vibração do grupo hidroxila (-OH) e o grupo contendo oxigênio alifático (-C-O), característicos de biocarvões oriundos de materiais lignocelulósicos e de lodo anaeróbio (JANG et al., 2018; JOHNRAVINDAR et al., 2021). A aromaticidade dos alongamentos identificados e a grafitação do material, associados à estrutura  $\pi$  conjugada, aumentam a condutividade do biocarvão (STRAUSS e KLUEPFEL, 2015; IFTHIKAR et al., 2017; QI et al., 2021). A banda em 2922  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada ao alongamento dos grupos metil (-CH<sub>3</sub>) e metileno (CH<sub>2</sub>). Os sinais entre 1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  e entre 500 - 600  $\text{cm}^{-1}$  são referentes aos alongamentos em grupos aromáticos (-C=C) e alifáticos (-CH), respectivamente, atribuídos à hidroxila terciária, secundária e primária, além de ésteres e alcanos. As bandas entre 1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  e 500 - 600  $\text{cm}^{-1}$  são características dos grupos funcionais quinona e fenazina, respectivamente, que são consideradas frações fenólicas redox-ativas, que contribuem diretamente para a capacidade de troca de elétrons baseada em reações redox (CHEN et al., 2014; SHANMUGAM et al., 2018; WANG et al., 2018; JOHNRAVINDAR et al., 2021). Dessa forma, tanto os grupos aromáticos e alifáticos, quanto a quinona e fenazina, presentes na estrutura do biocarvão podem estimular a DIET, promovendo a oxidação dos ácidos orgânicos na digestão anaeróbia, além de auxiliar na manutenção da alcalinidade no sistema (GIWA et al., 2019). Além disso, os alongamentos dos grupos hidroxila (3500 - 3300  $\text{cm}^{-1}$ ) e do grupo aromático (500 - 600  $\text{cm}^{-1}$ ) contribuem para a alcalinidade do biocarvão, e, conseqüentemente, auxiliam no tamponamento do sistema durante a digestão anaeróbia (MCBEATH et al., 2011; QI et al., 2021).

#### e) Isotermas de Adsorção

Os testes de adsorção foram realizados com o intuito de verificar se a adição de biocarvão aos ensaios metanogênicos poderia promover a adsorção de matéria orgânica em termos de DQO solúvel (DQOf). Os resultados demonstraram que a quantidade de matéria orgânica adsorvida por grama de biocarvão foi de aproximadamente 33,8±0,8  $\text{mg g}^{-1}$ . Dessa forma, os ensaios nas fases IV e V foram realizados considerando o percentual de adsorção da DQOf, em função da massa de biocarvão utilizada. A Tabela 25 contém as constantes e os coeficientes de correlação para os modelos de Langmuir e Freundlich.

**Tabela 25** - Parâmetros das isotermas de Langmuir e Freundlich na adsorção de matéria orgânica.

Langmuir			Freundlich		
$q_{\max}$ (mg g <sup>-1</sup> )	$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	$R^2$	$K_F$ (mg g <sup>-1</sup> )	$n$	$R^2$
35,9	0,001767	0,9033	0,0182	0,752	0,8651

Destaca-se que a maioria dos estudos de adsorção com biocarvão reportados na literatura são realizados a partir de efluentes sintéticos considerando moléculas modelo, ou seja, uma molécula específica a ser adsorvida. No presente estudo, a adsorção ocorreu de forma particular, devido à complexidade da composição da ARFM. Neste caso, a remoção de DQOf pode estar relacionada à redução dos sítios ativos do BC e ao fato de que algumas substâncias, presentes na água residuária, podem não ser adsorvidas pelo biocarvão (SHI et al., 2020; CHENG et al., 2022).

Os dados do experimento se ajustaram ao modelo de Langmuir ( $R^2$  0,903), sugerindo que a adsorção ocorreu em monocamada e em sítios ativos específicos do biocarvão (KWAK et al., 2019; SHIMABUKU et al., 2022). Com adsorção reduzida de matéria orgânica, os dados não se ajustaram ao modelo de Freundlich ( $R^2$  0,8651), que propõe que a adsorção ocorre em multicamadas, na qual a energia de adsorção decresce em uma função logarítmica (TAN et al., 2008). O valor de “n” desse modelo indica a afinidade entre o adsorvente e o adsorvato e, quanto maior o valor de “n”, maior a interação entre eles (KWAK et al., 2019). No entanto, nota-se que esse valor foi inferior a 1, indicando baixa afinidade entre o biocarvão e a matéria orgânica da ARFM.

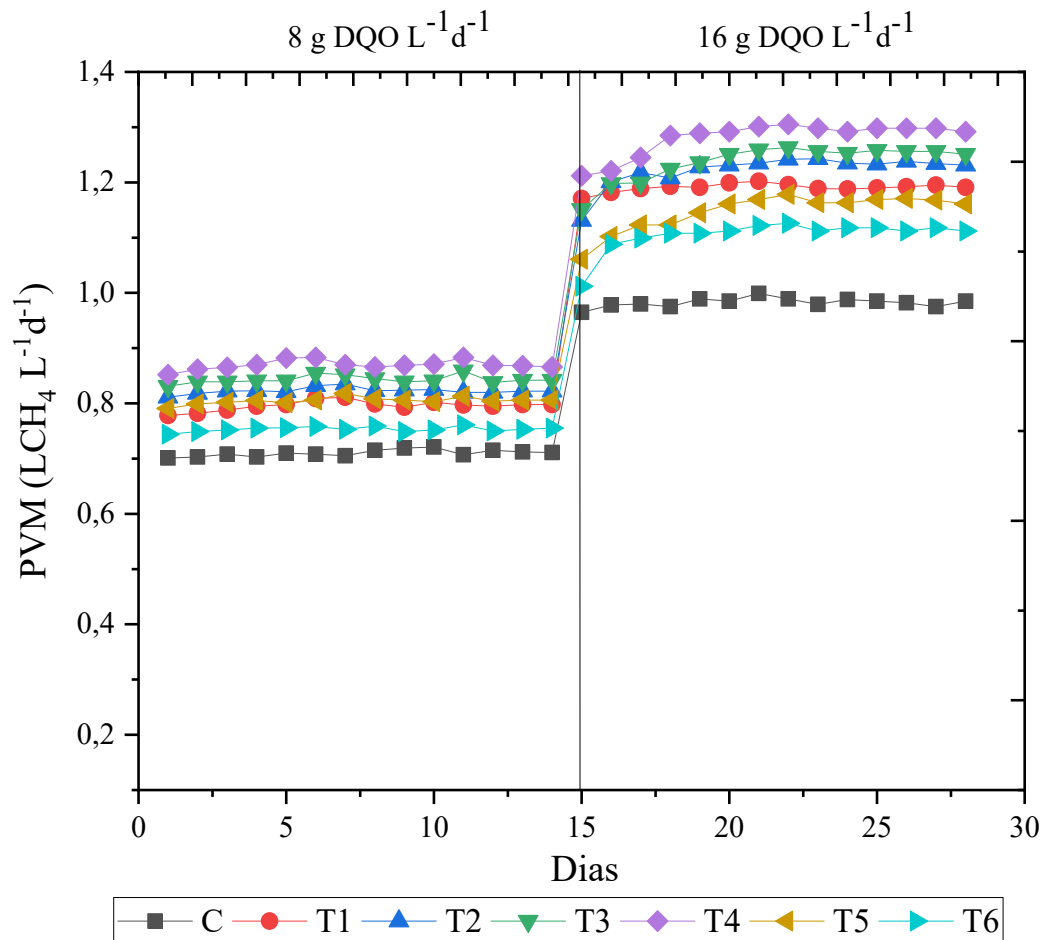
Os biocarvões produzidos em temperaturas elevadas de pirólise (superior a 600 °C) podem ser eficientes na remoção de contaminantes orgânicos devido a sua elevada área superficial e microporosidade (TAN et al., 2008; XU et al., 2014; KWAK et al., 2019). No presente estudo, a baixa quantidade de matéria orgânica adsorvida possivelmente está relacionada às elevadas concentrações de matéria orgânica aplicada e ao fato do biocarvão testado não ser ativado (SHIMABUKU et al., 2022). Além disso, em temperaturas de pirólise superiores a 450 °C, o biocarvão torna-se menos polar e mais aromático devido à perda dos grupos funcionais contendo oxigênio e hidrogênio. Isso afeta a capacidade de adsorção do material para contaminantes orgânicos aquosos polares (MASEBINU, et al., 2019).

A partir da caracterização do biocarvão, foram verificadas características importantes para seu uso na digestão anaeróbia, como área de superfície, elevada alcalinidade e condutividade, elevado grau de aromaticidade e a presença de grupos funcionais de superfície que são essenciais para promover a transferência de elétrons entre os microrganismos. Dessa

forma, foram testadas diferentes dosagens do material a fim de verificar sua influência sobre a metanogênese.

#### 5.4.2 Efeito do biocarvão na produção de metano

Diferentes concentrações de BC foram avaliadas nos ensaios T1 ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ); T2 ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ); T3 ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ); T4 ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ); T5 ( $3,0 \text{ g L}^{-1}$ ), T6 ( $6,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e controle (C), no qual não houve adição de BC. A Figura 28 apresenta a produção de metano de todos os ensaios durante a operação das condições i (TC de 12 h e COV de  $8 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e ii (TC de 6 h e COV de  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). Em todos os ensaios com adição de biocarvão foi verificada produção de metano maior do que a observada no ensaio controle (C).



**Figura 28** – Produção volumétrica de metano para as condições i (TC 12h e COV de  $8 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e ii (TC de 8 h e COV de  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), sendo C o ensaio controle (sem biocarvão) e T os ensaios com adição de biocarvão.

Para a condição i, nos ensaios T1 - T4, nota-se um comportamento semelhante em relação ao aumento da produção de metano (de  $0,798 \pm 0,032$  até  $0,883 \pm 0,028 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), que foi proporcional ao aumento da concentração de biocarvão, enquanto os ensaios T5 e T6, nos

quais foram adicionadas as maiores concentrações de BC (3,0 e 6,0 g L<sup>-1</sup>), apresentaram as menores produções de CH<sub>4</sub> (0,801 e 0,756 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). De acordo com a análise de variância (ANOVA), não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os ensaios T1, T5 e T6 para a condição i (TC de 12h e COV 8 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), no entanto, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas entre os ensaios T2, T3 e T4 em relação ao controle (C). Destaca-se que no ensaio T4 (2,0 g L<sup>-1</sup>) a produção de metano foi 29% maior que a do ensaio sem adição de biocarvão (C). A adição de BC proporcionou aumento na concentração de metano no biogás, com 88% no ensaio T4, enquanto no ensaio controle o teor de metano foi de 75%.

Na condição ii, com a redução do tempo de ciclo para 6 h e aumento da COV para 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, houve aumento na produção volumétrica de metano, mantendo-se entre 1,19±0,022 – 1,33±0,052 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para os ensaios T1 -T4. As menores produções de metano ocorreram para os ensaios T5 (1,16±0,044 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>); T6 (1,08±0,038 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e C (0,985±0,033 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) na produção de metano entre os ensaios T1 e T5, demonstrando que a adição de 4,0 gbiocarvão L<sup>-1</sup> do ensaio T5 (1,16 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) apresentou a mesma eficiência na produção de metano que a adição de 0,5 g L<sup>-1</sup> do ensaio T1 (1,19 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os ensaios T6 e C, e, em relação aos demais ensaios, foi verificado que a adição da maior dosagem testada de biocarvão (6 g L<sup>-1</sup>) contribuiu para diminuir a produção de metano. Em contrapartida, os ensaios T3 (1,5 g L<sup>-1</sup>) e T4 (2,0 g L<sup>-1</sup>) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao ensaio C, com produção de metano até 30% superior ao ensaio controle. Além disso, assim como identificado na condição i, a adição de biocarvão proporcionou aumento no teor de metano no biogás, alcançando 86% no ensaio T4 (2,0 g L<sup>-1</sup>), enquanto o ensaio controle apresentou apenas 63%.

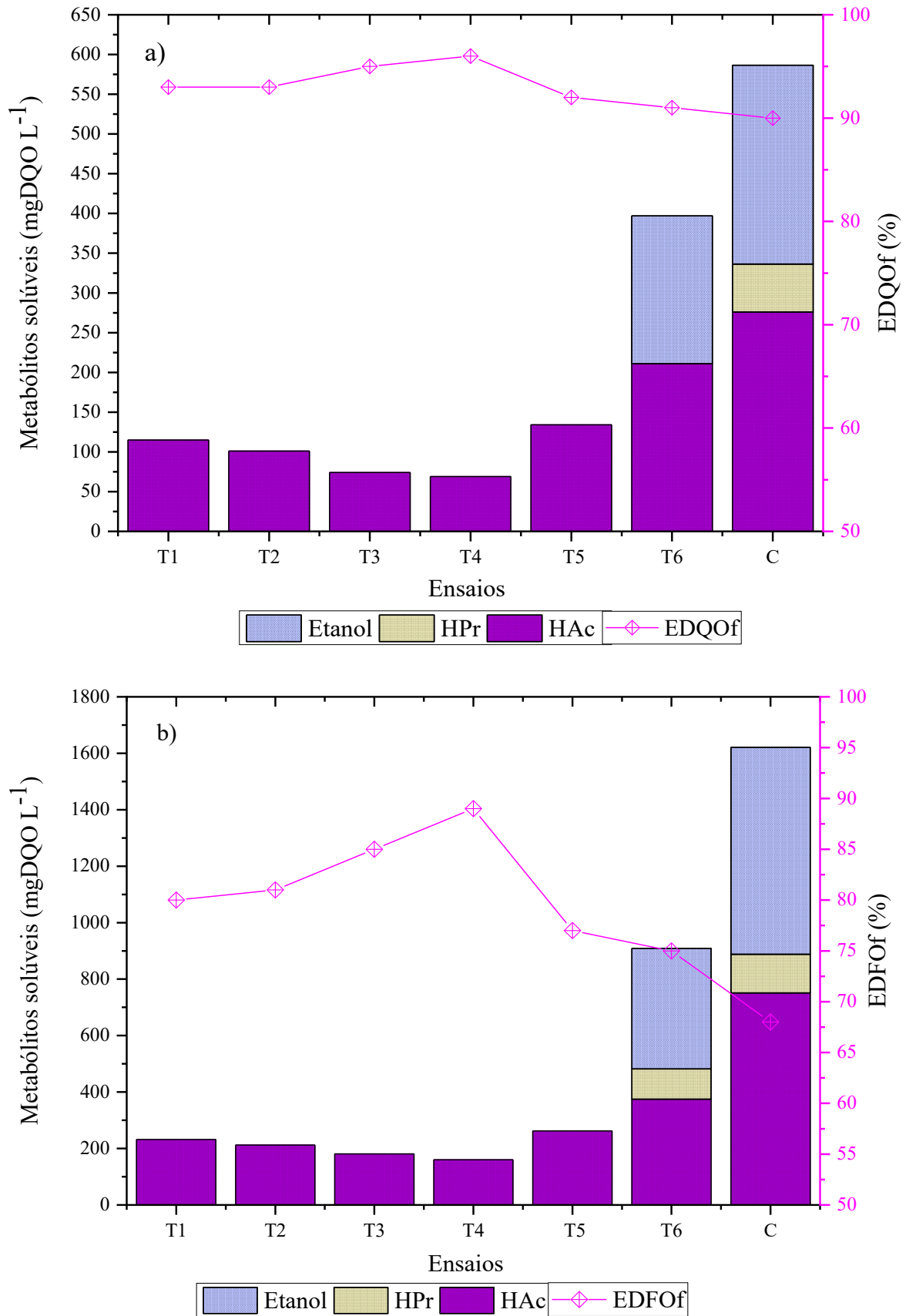
Embora o BC tenha estimulado a produção de metano nos ensaios T1-T4, notou-se que as maiores concentrações dos ensaios T5 (3,0 g L<sup>-1</sup>) e T6 (6,0 g L<sup>-1</sup>) provocaram redução da produção de metano em ambas as condições testadas, o que pode estar relacionado à adsorção do metano pelo excesso de biocarvão e pela redução na transferência de massa entre substrato e microrganismos (SUNYOTO et al. 2016; WANG et al., 2018b; SAIF et al. 2021). Verificou-se que o BC aderiu ao material suporte e aumentou a espessura do biofilme, conforme será discutido no item 5.4.4, possivelmente reduzindo a disponibilidade de substrato aos microrganismos presentes nas camadas mais internas. Sunyoto et al. (2016) observaram comportamento semelhante ao avaliarem a adição de diferentes dosagens de BC (8,3 a 33,3 g L<sup>-1</sup>) durante a codigestão anaeróbia de resíduo de pão branco e lodo anaeróbio em um sistema

operado em duas fases. Os autores observaram que a aplicação de dosagens de biocarvão superiores a  $16,6 \text{ g L}^{-1}$  ocasionaram redução de 20% na produção de  $\text{CH}_4$  e associaram sua diminuição à adsorção do metano pelo biocarvão e à redução nas taxas de transferência de massa entre substrato e microrganismos.

Ainda não há consenso em relação à quantidade de BC a ser adicionado em digestores anaeróbios, o que pode variar conforme as características do biocarvão, do substrato e das condições operacionais. Wang et al. (2018) avaliaram a codigestão anaeróbia de resíduos de alimentos e lodo anaeróbio (4:1 m/m) aplicando diferentes concentrações de BC ( $2 - 15 \text{ g L}^{-1}$ ) à mistura. Os autores verificaram que a dosagem de  $15 \text{ g biocarvão L}^{-1}$  diminuiu a fase lag em até 64% e melhorou a taxa de produção de metano em 40%, tal resultado, se deve ao aumento da abundância relativa dos gêneros *Anaerolineaceae* e *Metanosaeta*. Sunyoto et al. (2016) obtiveram aumento de 32,5% e 41,6% na taxa de produção de hidrogênio e metano, com adição de  $16,6 \text{ g L}^{-1}$  de BC. Zhang et al. (2020), testaram concentrações entre  $6 - 30 \text{ g L}^{-1}$  de biocarvão na codigestão entre lodo anaeróbio e restos de alimento (2:1 m/m), obtendo produção de metano de até  $0,543 \text{ LCH}_4 \text{ gSV}^{-1}$  para dosagem de  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Comparados à literatura, os resultados desse estudo indicam que a melhora na produção de metano foi obtida com a adição de menores concentrações de biocarvão, principalmente para a dosagem de  $2 \text{ g L}^{-1}$ , o que pode ser vantajoso em termos econômicos, representando menores gastos com a produção e uso desse material condutor.

#### 5.4.3 Efeito do biocarvão no consumo de metabólitos e matéria orgânica

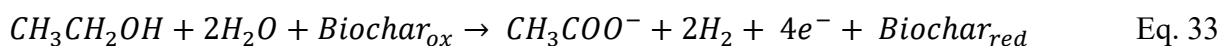
Ao longo da condição operacional i (TC de 12h e COV de  $8 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), o pH efluente manteve-se na faixa de 8,0 a 8,7, cujo menor valor (8,0) foi verificado no ensaio controle, demonstrando que com a adição de biocarvão o pH efluente manteve-se mais elevado, mesmo em condições de excesso do material. Ao reduzir o tempo de ciclo para 6 h (condição ii), o pH manteve-se entre 7,3 – 8,5, mantendo-se superior a 8,0 para todos os ensaios com adição de BC. A redução do pH de 8,0 para 7,3 no ensaio C ocorreu, possivelmente, devido ao aumento na concentração de metabólitos, que passou de  $586 \text{ mgDQO L}^{-1}$ , na condição i, para  $1621 \text{ mgDQO L}^{-1}$  na condição ii, proporcionado pela redução do tempo de ciclo e aumento da carga orgânica. A Figura 29 apresenta as eficiências de remoção de matéria orgânica, em termos da DQO filtrada ( $\epsilon \text{DQOf}$ ), e as concentrações de metabólitos solúveis no efluente de cada um dos ensaios.



**Figura 29** – Concentração de metabólitos solúveis no efluente final dos ensaios T1 (0,5 g L<sup>-1</sup>); T2 (1,0 g L<sup>-1</sup>); T3 (1,5 g L<sup>-1</sup>); T4 (2,0 g L<sup>-1</sup>); T5 (3,0 g L<sup>-1</sup>) e T6 (6,0 g L<sup>-1</sup>) e Controle (C); e eficiência de remoção de matéria orgânica (EDQOf) considerando: a) condição operacional i; b) condição operacional ii.

Em ambas as condições testadas, não foram observadas variações bruscas no pH efluente dos ensaios T1-T6 ou acúmulo de ácidos, constatando-se que a adição de BC favoreceu o tamponamento do processo, mantendo o pH em condições favoráveis para a produção de metano. De acordo com Yuan et al. (2011) e Gul et al. (2015), os grupos funcionais carboxila (-COO- (-COOH) e hidroxila (-O-(-OH), comumente presentes no biocarvão de origem lignocelulósica produzidos em temperaturas elevadas de pirólise (entre 500 - 800°C), propiciam o aumento da alcalinidade desse material, auxiliando no tamponamento do processo durante a metanogênese. Além disso, a presença de elementos químicos como K e P, que constituíram cerca de 2,04% em massa do biocarvão do presente estudo, sugerem que esse material é alcalino (INDREN et al., 2020; JOHNRAVINDAR et al., 2021).

Nas condições i e ii as eficiências de remoção de matéria orgânica variaram entre 90 - 96% e de 68 - 90%, respectivamente. As menores eficiências foram observadas para o ensaio controle (C), sem BC. Considerando a concentração total de metabólitos solúveis no afluente de  $4318 \pm 374 \text{ mgDQO L}^{-1}$ , os ensaios com adição de BC possibilitaram a degradação de até 95% dos metabólitos, com concentrações finais de  $69 \text{ mgDQO L}^{-1}$  (condição i,  $8 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e TC de 12 h) e  $160 \text{ mgDQO L}^{-1}$  (condição ii,  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e TC de 6 h) no efluente do ensaio T4. A concentração remanescente de ácido acético no efluente de todos os ensaios pode estar relacionada à elevada concentração desse metabólito na ARFM acidificada ( $> 1880 \text{ mgDQO L}^{-1}$ ) e à conversão dos demais metabólitos em acetato para posterior conversão em metano. Embora concentrações elevadas de etanol tenham sido verificadas no afluente ( $> 1750 \text{ mgDQO L}^{-1}$ ), o consumo desse metabólito nos ensaios T1 a T5 possivelmente está relacionado ao biocarvão, que pode estimular sua conversão em acetato (WANG e ZHAO, 2009; WHITE et al., 2012). A presença de biocarvão pode favorecer o enriquecimento de culturas nas quais o etanol pode atuar como doador de elétrons e o biocarvão como acceptor de elétrons, como os microrganismos dos gêneros *Geobacter* e *Anaerolinea* (CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2018), conforme a equação 33 (CHEN et al., 2014).



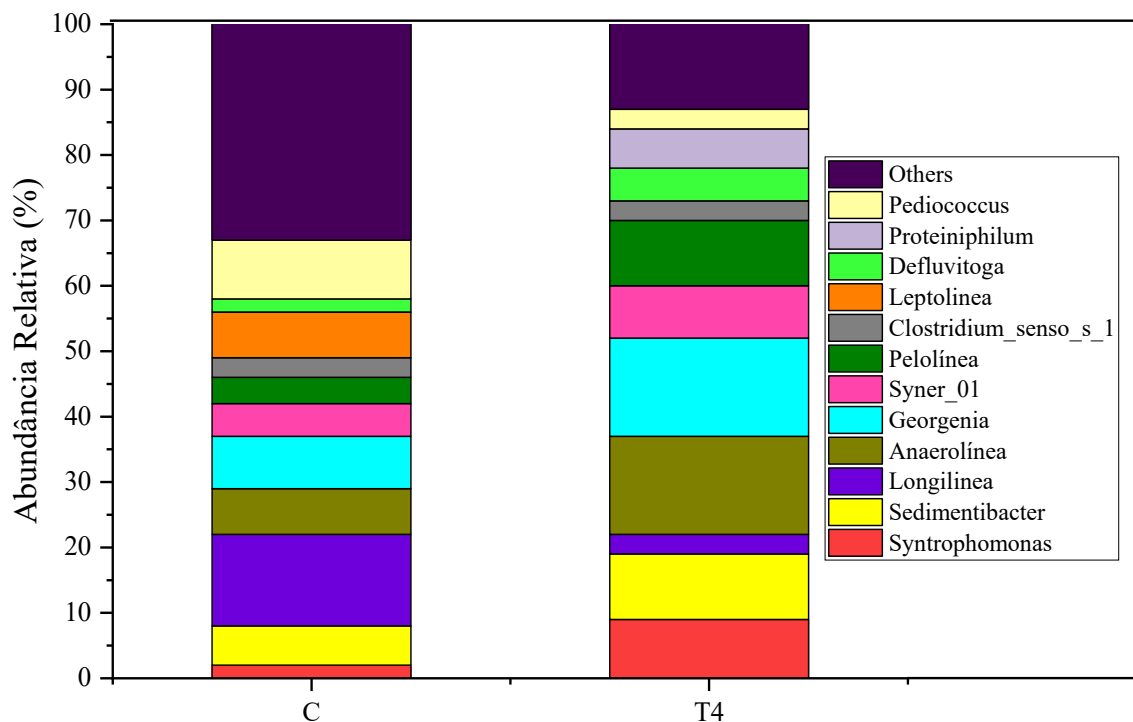
Nos ensaios T6 e C o perfil dos metabólitos foi semelhante, verificando-se que o excesso ( $6,0 \text{ g L}^{-1}$ ) ou a ausência do BC resultou em menor conversão de ácidos orgânicos em metano, comparado aos demais ensaios. As concentrações de ácido acético no efluente desses ensaios foram até 70% superiores às concentrações nos ensaios T1 - T5. Além disso, a presença de etanol e ácido propiônico não foi identificada no efluente dos ensaios T1 - T5, enquanto os ensaios T6 e C apresentaram concentrações superiores a  $100 \text{ mgDQO L}^{-1}$  e  $400 \text{ mgDQO L}^{-1}$ ,

respectivamente. Conforme discutido no item 5.4.2, o excesso de biocarvão no ensaio T6 pode ter contribuído para adsorção do substrato, afetando a transferência de massa entre substrato e microrganismos. Em contrapartida, a adição de BC contribui para o aumento da condutividade elétrica e doação de elétrons entre bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas, o que pode ter acelerado a conversão dos metabólitos solúveis em acetato e do acetato em metano nos ensaios T1-T5 (LUO et al., 2015; LU et al., 2016; WANG et al., 2018b; PARK et al., 2019; WANG et al., 2020).

#### 5.4.4 Efeito da adição de diferentes dosagens de biocarvão na comunidade microbiana

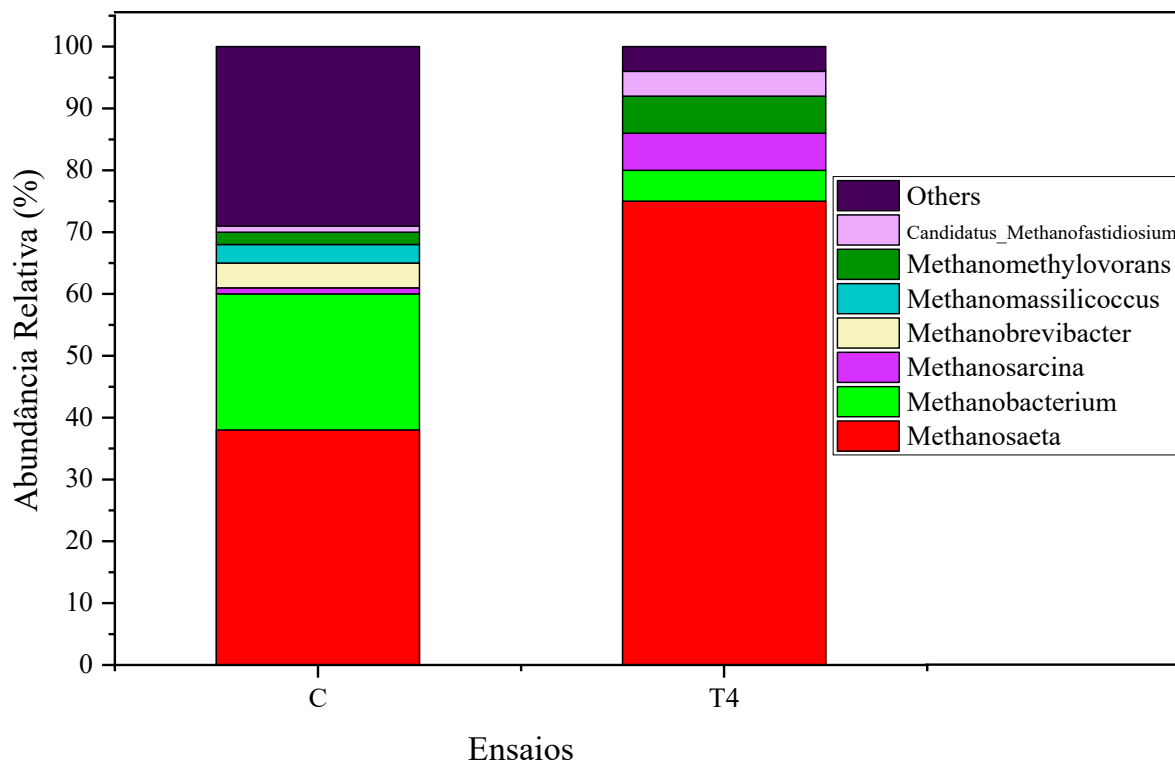
A adesão de microrganismos ao biocarvão ocorre devido às propriedades físicas e químicas da superfície do material, incluindo aspectos como a área superficial, porosidade e composição química do BC (ZHANG et al., 2018; GAHLOT et al., 2020). A composição do BC com relações H/C e O/C de 0,02 e 0,30, menores que 0,09 e 0,35 (SUN et al., 2017), beneficia a formação de estruturas de carbono com baixa resistência à transferência de elétrons, e, quando aliadas às estruturas aromáticas do biocarvão, funcionam como mediadoras de elétrons entre espécies de microrganismos (SUN et al., 2017; QI et al., 2021). Ainda nesse sentido, baixas razões O/C, em conjunto com a natureza alcalina do biocarvão, podem indicar hidrofobicidade, o que favorece a capacidade de atrair de microrganismos (SUN et al., 2017; WANG et al., 2018; GIWA et al., 2019; JONHAVINDAR et al., 2021).

A análise metagenômica foi realizada ao final da condição ii (COV de 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 6 h) para os ensaios T4 (2 g L<sup>-1</sup>) e Controle. O índice de Simpson (baseado no total de espécies) diminuiu de 0,89 (C) para 0,86 (T4), indicando que a adição do BC diminuiu a diversidade das comunidades bacterianas, proporcionando a predominância de algumas espécies de microrganismos no ensaio T4. Em comparação ao ensaio C, a adição de 2 g L<sup>-1</sup> de biocarvão no ensaio T4 aumentou em 50% a abundância relativa dos gêneros: *Anaerolínea*; *Georgenia* e *Syner\_01*, e em 60% os gêneros *Pelolínea* e *Syntrophomonas*, enquanto o gênero *Proteiniphilum*, que não foi identificado no ensaio Controle, apresentou abundância relativa de 6% no ensaio T4 (Figura 30).



**Figura 30** – Abundância relativa dos Gêneros de bactérias presentes nos ensaios C (sem adição de BC) e T4 (2 gbiocarvão L<sup>-1</sup>).

*Georgania* é um gênero de bactérias do filo *Actinobacteria*, que está relacionado à degradação de compostos aromáticos e lignocelulósicos (WANG et al., 2021b), e que pode estar relacionado ao material suporte composto pelas ramas de mandioca. A capacidade de degradação de compostos aromáticos por microrganismos desse gênero foi favorecida com a adição de biocarvão, uma vez que a abundância desses microrganismos aumentou em 50% no ensaio T4. O gênero *Proteiniphilum* é capaz de oxidar ácido propiônico a acetato (WANG et al., 2018b), isso pode justificar a ausência desse metabólito no efluente do ensaio T4, enquanto concentrações de 130 mg L<sup>-1</sup> foram verificadas no efluente do ensaio Controle. De acordo com a literatura, os gêneros *Anaerolínea*, *Pelolínea* e *Syntrophomonas* contemplam espécies capazes de degradar ácidos orgânicos de cadeias curtas e longas, além de apresentarem genes *pilA* ou seja, filamentos de proteínas que contribuem para transferência de elétrons em longo alcance (YU et al., 2016; WANG et al., 2018; WANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020; QI et al., 2021). Dessa forma, há indícios de que os gêneros predominantes no ensaio T4 podem estabelecer associações sintróficas com as arqueas metanogênicas, principalmente *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, aumentando a produção de metano (QI et al., 2021). A Figura 31 representa a abundância relativa de arqueas metanogênicas nos ensaios T4 e C.



**Figura 31** – Abundância relativa dos Gêneros de arqueas metanogênicas presentes nos ensaios C (sem adição de BC) e T4 (2 gbiocarvão L<sup>-1</sup>).

A análise da abundância relativa das arqueas metanogênicas também indicou redução na diversidade de gêneros após a adição de BC, nessas condições, houve aumento na abundância do gênero *Methanosaeta* de 35% (C) para 75% (T4). Luo et al. (2015) e Qi et al. (2021) observaram comportamento semelhante ao comparar um reator anaeróbico alimentado com substrato sintético a base de sacarose e lodo anaeróbico quanto à adição ou não de BC. De acordo com os autores, o biocarvão pode diminuir o efeito negativo da acidificação do substrato sobre os microrganismos do gênero *Methanosaeta*, que utilizam exclusivamente acetato na metanogênese, pois o BC proporciona condições de troca de elétrons, de modo que as reações químicas ocorram mais rapidamente, acelerando a conversão do ácido acético em metano (GUO et al., 2015). Na presença de materiais condutivos, as arqueas do gênero *Methanosaeta* podem reduzir o dióxido de carbono a metano via DIET (MORITA et al., 2011; WANG et al., 2018b), principalmente a partir da troca de elétrons com microrganismos do gênero *Anaerolinea* (Xu et al., 2016; Wang et al., 2020). A redução de 77% da abundância relativa do gênero *Methanobacterium* (arqueas hidrogenotróficas) e o aumento de 76% da *Methanosarcina* no ensaio T4 evidenciam que a adição de BC favoreceu o estabelecimento de culturas acetoclásticas (CHEN et al., 2014; SHEN et al., 2020; QI et al., 2021).

#### 5.4.5 Considerações finais da Fase IV

Os ensaios com adição de biocarvão proporcionaram produção de metano até 30% superior ao ensaio controle em ambas as condições operacionais testadas. Entre as dosagens analisadas, o ensaio T4 (2 g L<sup>-1</sup>) apresentou o melhor resultado em termos de produção de metano (1,33 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e eficiência de remoção de matéria orgânica (96%). Aliado ao aumento na produção de CH<sub>4</sub>, a adição de 2 gbiocarvão L<sup>-1</sup> possibilitou conversão de 90% dos metabólitos, mesmo em condições de tempo de ciclo reduzido (6 h). Os melhores resultados observados nos ensaios com BC podem estar relacionados à estrutura aromática e composição redox ativa do biocarvão, que favoreceram a predominância de microrganismos sintróficos relacionados à DIET, como as bactérias dos gêneros *Anaerolínea*, *Syner\_01*, *Pelolínea*, *Syntrophomonas* e *Proteiniphilum* em conjunto com arqueas dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, identificados no ensaio T4.

#### 5.5 FASE V - AnSBBR METANOGÊNICO COM ADIÇÃO DE BIOCARVÃO

Optou-se por avaliar o comportamento do reator metanogênico com adição de biocarvão (2 g L<sup>-1</sup>) para as COVs de 8; 12 e 16 gDQOL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, com os tempos de ciclo de 12, 8 e 6 h, compondo os ensaios V, VI e VII, respectivamente. A dosagem de 2 g L<sup>-1</sup> de biocarvão foi determinada a partir dos melhores resultados dos ensaios realizados na Fase IV.

##### 5.5.1 Desempenho do reator metanogênico em relação ao pH, alcalinidade e conversão de metabólitos

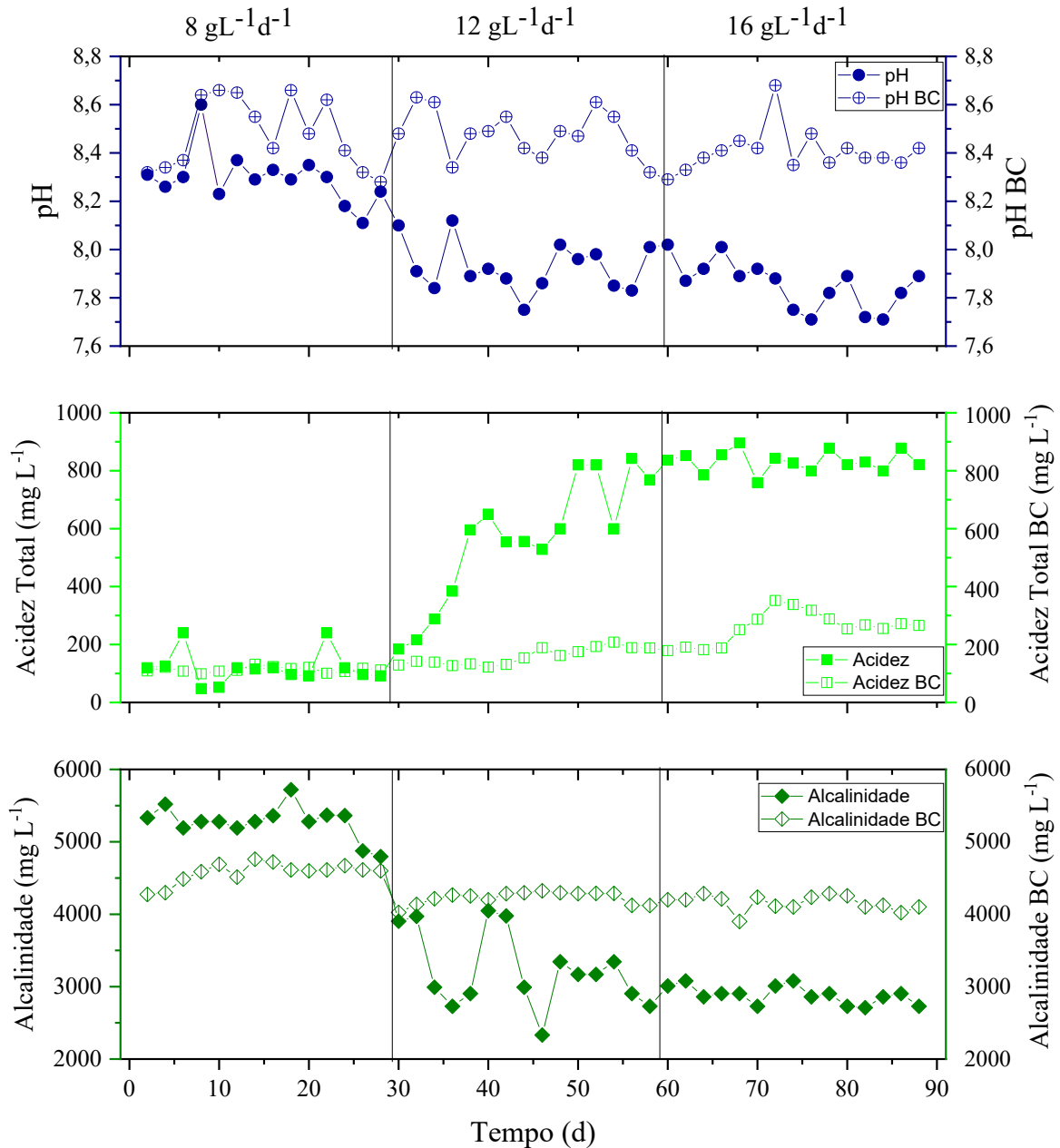
Os ensaios V, VI e VII foram realizados a partir da adição de 2gbiocarvão L<sup>-1</sup> no reator metanogênico. Entre as condições analisadas, observou-se que a adição do biocarvão provocou menor variação de pH, alcalinidade e acidez (Tabela 26). O pH efluente manteve-se elevado e acima de 8,0 para todos os ensaios, com valor máximo de 8,7 no ensaio V (COV 8 gDQOL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). Ao longo dos ensaios, a alcalinidade aumentou de aproximadamente 1830±222 mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (média do afluente acidificado) para concentrações acima de 4111±111 mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, enquanto houve redução da concentração de acidez volátil total de 2375±242 mgHAc L<sup>-1</sup> (média do afluente acidificado) para concentrações inferiores a 300 mgHAc L<sup>-1</sup> no efluente do reator metanogênico.

**Tabela 26** – Indicadores de monitoramento do AnSBBR metanogênico para as condições testadas com adição de BC.

Ensaio	COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo de ciclo (h)	pH efluente	Alcalinidade Parcial (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )		Acidez volátil total (mgHAc L <sup>-1</sup> )		AV/AT
				Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	
V	8	12	8,4±0,2	1820±53	4489±218	2488±297	101±24	0,025±0,002
			<b>8,7</b>	<b>2176</b>	<b>4760</b>	<b>2920</b>	<b>132</b>	
VI	12	8	8,4±0,1	1811±23	4169±177	2263±286	184±22	0,052±0,01
			<b>8,6</b>	<b>2190</b>	<b>4323</b>	<b>2678</b>	<b>208</b>	
VII	16	6	8,3±0,1	1860±224	4111±111	2364±376	274±68	0,075±0,02
			<b>8,5</b>	<b>2200</b>	<b>4221</b>	<b>2760</b>	<b>352</b>	

COV – Carga orgânica volumétrica; AV/AT: relação acidez total e alcalinidade total. \*\*Os valores em negrito representam os valores máximos.

A Figura 32 apresenta a comparação entre os parâmetros pH, acidez total e alcalinidade nos ensaios II, III e IV (sem BC) e V, VI e VII (com adição de BC). O pH efluente dos ensaios com adição de biocarvão manteve-se entre 8,3 e 8,4, enquanto nos ensaios da Fase III o aumento de carga e redução do tempo de ciclo ocasionou um pequeno decréscimo do pH para 7,8. Embora a alcalinidade no efluente dos ensaios sem BC tenha se mantido elevada, acima de 3001±129 mg L<sup>-1</sup>, é importante ressaltar que nesses ensaios a relação NaHCO<sub>3</sub>/DQO foi mantida em aproximadamente 0,38, enquanto nos ensaios com BC, essa relação foi três vezes menor (NaHCO<sub>3</sub>/DQO de 0,12). Ou seja, a adição de biocarvão foi eficiente para o tamponamento do reator, reduzindo o uso de fonte externa de alcalinidade. Wang et al. (2021a) e Qi et al. (2021) relataram que a adição de biocarvão controla a acidez total em reatores metanogênicos operados com elevadas COVs, devido à sua capacidade de atuar como provedor de alcalinidade. Conforme mencionado na Fase IV (item 5.4), isso ocorre devido à capacidade alcalinizante dos grupos carboxila e hidroxila presentes nos anéis aromáticos do BC de origem lignocelulósica (YUAN e XU, 2011; GUL et al., 2015), e à presença de elementos alcalinos em sua estrutura, como P e K (INDREN et al., 2020; JOHNRAVINDAR et al., 2021).



**Figura 32** – Comparativo da variação de pH, alcalinidade e acidez total entre os ensaios sem adição de biocarbão e com adição (BC): ensaios II e V (COV  $8 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ); III e VI (COV  $12 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ); IV e VII (COV  $16 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ).

Verificou-se baixa concentração de ácidos voláteis totais ( $101 - 274 \text{ mgHAc L}^{-1}$ ) no efluente dos ensaios com biocarbão. Para a maior COV ( $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e menor tempo de ciclo (6 h) testados no reator metanogênico, a concentração de AOV no efluente do ensaio com biocarbão (VII) foi de  $274 \pm 48 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo 70% inferior à concentração de ácidos no efluente do ensaio IV ( $854 \pm 98 \text{ mg L}^{-1}$ ). A adição de BC também pode ter contribuído para a estabilidade do reator metanogênico, visto que as relações AV/AT ( $0,025 - 0,075$ ) e AI/AP ( $0,22 - 0,25$ ), apresentaram menor variação comparativamente aos ensaios sem biocarbão (AV/AT entre  $0,026 - 0,221$  e AI/AP entre  $0,2 - 0,3$ ) e mantiveram-se abaixo dos limites de  $0,5$  e  $0,3$ ,

sugeridos pela literatura para esses indicadores, respectivamente (RIPLEY et al., 1986; SÁNCHEZ et al., 2005).

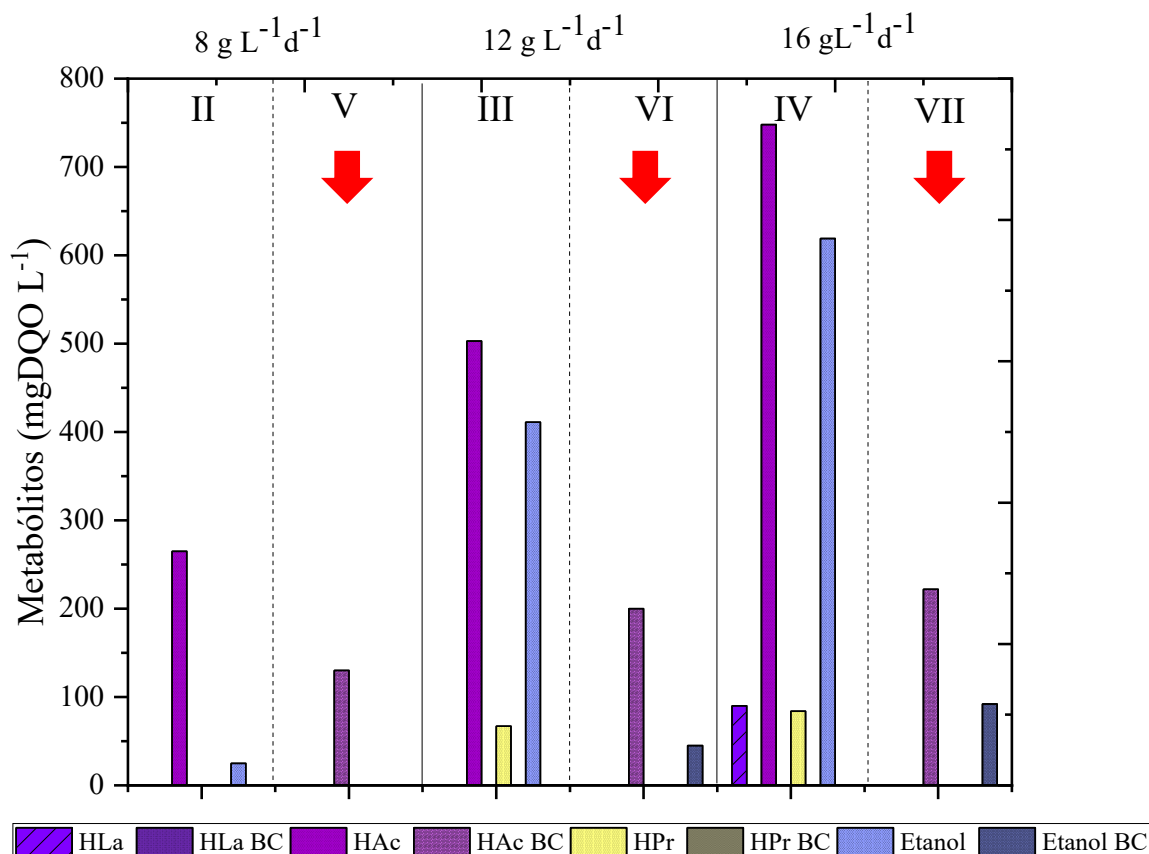
A Tabela 27 apresenta a concentração dos metabólitos solúveis no efluente dos ensaios V, VI e VII. Considerando concentrações iniciais de metabólitos de aproximadamente  $4318 \pm 374$  mgDQO L<sup>-1</sup> no afluente, proveniente do reator acidogênico, foram verificadas eficiências de conversão de 95% para o ensaio V e acima de 85% para os ensaios VI e VII.

**Tabela 27** – Concentração média dos metabólitos presentes no efluente dos ensaios V, VI e VII.

	Metabólitos (mgDQO L <sup>-1</sup> )				
	HLa	HBu	HAc	HPr	Etanol
V	n.d.	n.d.	130±27	n.d.	n.d.
VI	n.d.	n.d.	200±88	n.d.	45±19
VII	n.d.	n.d.	222±52	n.d.	92±23

\*n.d.: Valores não detectados.

O incremento da COV (8 para 16 gDQOL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e redução do TC (12 para 6 h) provocou um aumento ínfimo na concentração de metabólitos solúveis no efluente dos ensaios V, VI e VII, sendo estes compostos pelo ácido acético (130 – 222 mgDQO L<sup>-1</sup>) e etanol (45 - 92 mgDQO L<sup>-1</sup>). Diferentemente do sistema sem adição de biocarvão (ensaios II, III e IV), no qual foi observado aumento gradual na concentração de ácidos no reator (Figura 33). De forma semelhante aos resultados observados nesse estudo, Sunyoto et al. (2016) avaliaram a produção de metano em um sistema anaeróbio operado em duas fases com adição de 16 gbiocarvão L<sup>-1</sup>, utilizando resíduos de pão como substrato (33,1 mmolAOVL<sup>-1</sup>). Os autores observaram conversão de 90% dos AOV, com concentrações residuais no efluente abaixo de 5 mmol L<sup>-1</sup> e aumento de 41,6% na taxa de produção de metano. Shen et al. (2017) analisaram a adição de 0,5 gbiocarvão L<sup>-1</sup> em um sistema em duas fases alimentado com lodo obtido de um sistema de lodos ativados (COV de 2,0 g SVT L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), e verificaram conversão de 80% do ácido acético em metano, com produção de até 342 mLCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

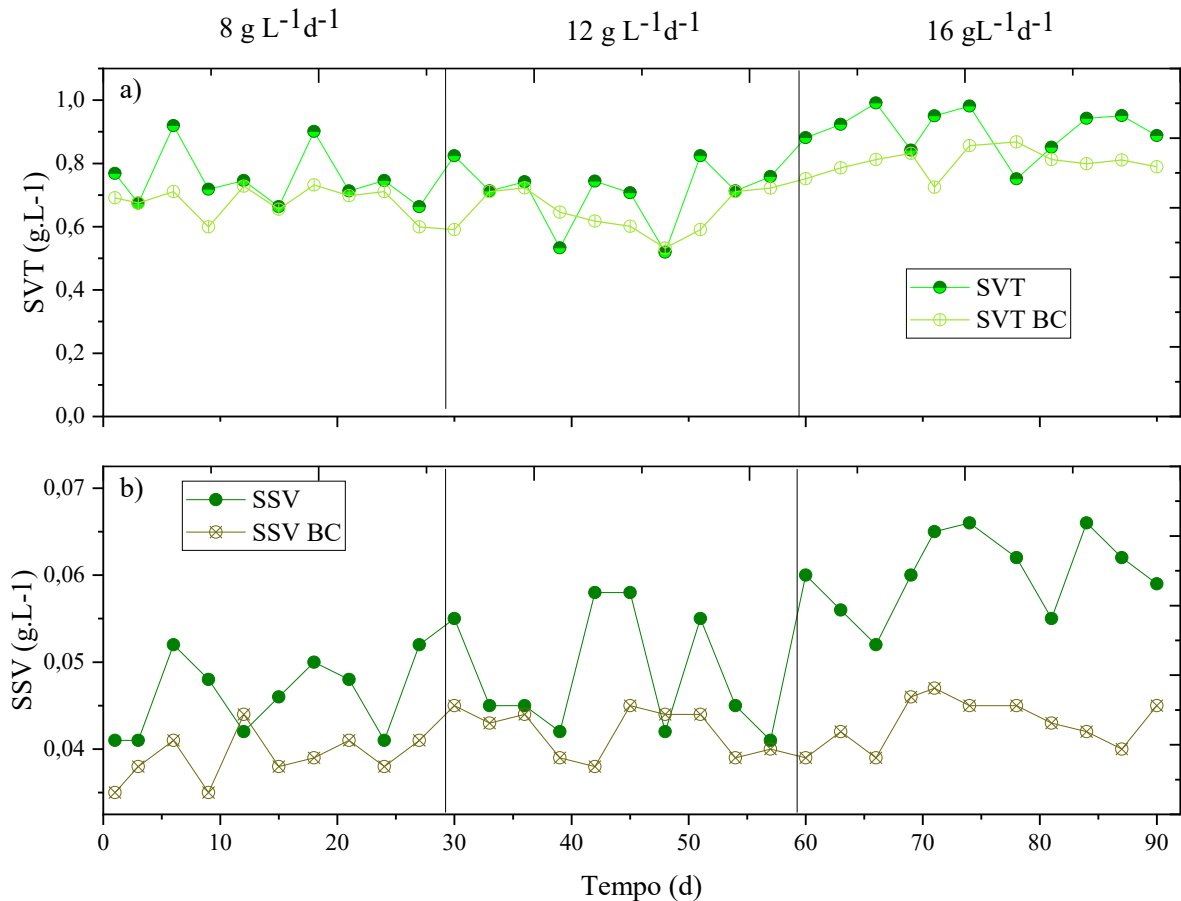


**Figura 33** – Concentração de metabólitos no efluente dos ensaios II, III, IV (sem adição de BC) e V, VI, VII (com adição de BC), as setas em vermelho destacam as baixas concentrações nos ensaios com biocarvão.

Os ácidos láctico, butírico e propiônico não foram detectados no efluente dos ensaios V, VI, VII, possivelmente devido à: i) capacidade do BC em acelerar as reações bioquímicas de conversão desses metabólitos (LI et al., 2018; WANG et al., 2020); ii) favorecimento de culturas microbianas capazes de metabolizar esses ácidos; iii) à baixa concentração desses metabólitos no afluente, oriundo do reator acidogênico. As concentrações de etanol ( $92 \pm 23$  mgDQO L<sup>-1</sup>) e ácido acético ( $222 \pm 52$  mgDQO L<sup>-1</sup>) no efluente do ensaio VII podem estar relacionadas às concentrações elevadas destes metabólitos no efluente do reator acidogênico ( $> 1800$  e  $1700$  mgDQO L<sup>-1</sup>, respectivamente) e a diminuição do tempo de ciclo. Em contrapartida, considerando o tempo de ciclo de 6 h, o efluente do ensaio IV (sem BC) apresentou concentrações elevadas de etanol ( $619 \pm 56$  mgDQO L<sup>-1</sup>), ácido acético ( $748 \pm 63$  mgDQO L<sup>-1</sup>), láctico ( $90 \pm 51$  mgDQO L<sup>-1</sup>), e propiônico ( $84 \pm 9$  mgDQO L<sup>-1</sup>), o que indica que a adição de BC de fato acelerou a conversão dos metabólitos em acetato. Comportamento semelhante foi observado por Wang et al. (2020), que analisaram a termodinâmica de degradação dos AOV a partir da adição de BC em um reator metanogênico em condições de acidificação (concentração de ácidos de  $57,9$  gDQO L<sup>-1</sup> e pH inferior a 5). Os autores verificaram que a adição de

20gbiocarvão L<sup>-1</sup> manteve o  $\Delta G^0$  experimental do propionato e butirato em -10 e -20 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Em contrapartida, no sistema sem adição de BC, o  $\Delta G^0$  desses ácidos foi de 10 e 2 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando que o material condutor acelerou as reações metabólicas na digestão anaeróbia.

Em relação aos sólidos, a concentração média de sólidos totais (ST) no efluente do reator acidogênico foi de  $2,1 \pm 0,8$  g L<sup>-1</sup>, enquanto as concentrações médias no efluente dos ensaios V, VI e VII foram de  $0,92 \pm 0,1$ ;  $1,0 \pm 0,3$  e  $1,21 \pm 0,2$  g L<sup>-1</sup>, respectivamente. As concentrações de SVT e SSV ao longo do experimento nos ensaios II, III e IV (sem BC) e V, VI e VII (com BC) estão apresentadas na Figura 34.



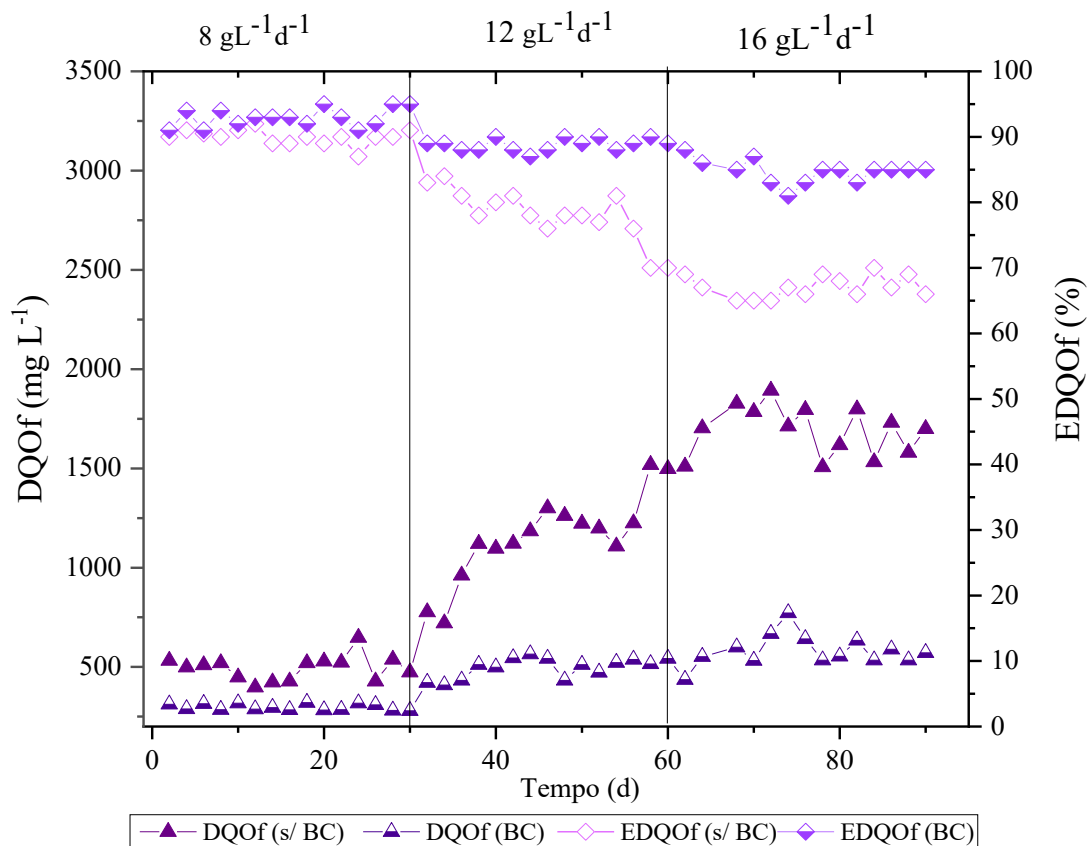
**Figura 34** – Variação nas concentrações de SVT e SSV no efluente dos ensaios II, III e IV (sem BC) e V, VI e VII (com BC).

Observa-se que os teores de ST no efluente nos ensaios V, VI e VII foram aproximadamente 26% menores em comparação aos ensaios sem biocarvão. A concentração de SVT no efluente foi semelhante em todos os ensaios, situando-se na faixa de 0,5 a 0,86 g L<sup>-1</sup>, enquanto a concentração média de SSV foi de 0,038 g L<sup>-1</sup>, no ensaio V, aumentando para 0,043 e 0,048 g L<sup>-1</sup>, nos ensaios VI e VII, respectivamente. A maior eficiência na redução de sólidos

dos ensaios da Fase V pode estar relacionada à porosidade do biocarvão e à possibilidade de adesão de microrganismos em sua estrutura. Achi et al. (2021), ao analisarem um reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais alimentado com água residuária de farinha de mandioca ( $33,7 \text{ gDQO L}^{-1}$ ), verificaram a redução de 62% dos SVT a partir da adição de 3 gbiocarvão  $\text{gSVT}^{-1}$ . De acordo com os autores, a porosidade e a área superficial do BC colaboram para a adesão dos microrganismos à sua superfície, contribuindo para a maior eficiência na redução de sólidos durante a digestão anaeróbia.

### 5.5.2 Efeito da adição de biocarvão na remoção de matéria orgânica do reator metanogênico

A Figura 35 ilustra a eficiência de remoção e a concentração de matéria orgânica no efluente dos ensaios II, III e IV (sem BC) e V, VI e VII (com BC). A eficiência de remoção de matéria orgânica manteve-se acima de 80% em todos os ensaios da Fase V, alcançando eficiência máxima de 96%, no ensaio V (COV de  $8 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e TC de 12 h).



**Figura 35** - Remoção de matéria orgânica ao longo dos experimentos no reator metanogênico. DQOf - DQO filtrada efluente; EDQOf - eficiência de remoção de DQO filtrada.

A eficiência de remoção média de matéria orgânica manteve-se entre 85 - 94% nos ensaios V - VII, apresentando baixa variação com o incremento da COV e redução do tempo de ciclo. A influência do BC na remoção de matéria orgânica se tornou evidente principalmente

para COV de  $16 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e TC de 6 h (VII), no qual o efluente apresentou DQO de  $612 \pm 58 \text{ mg L}^{-1}$ , com eficiência de remoção de 85%, enquanto no ensaio IV (sem BC), essa concentração foi quase três vezes maior ( $1618 \pm 253 \text{ mg L}^{-1}$ ), com 67% de eficiência de remoção. Zhao et al. (2015) também reportaram eficiências de remoção de matéria orgânica acima de 75% em ensaios com adição de materiais condutivos. Os autores avaliaram o consumo de etanol e acetato e a produção de metano em reatores UASB com adição de grafite ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), biocarvão ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e tecido de fibra de carbono ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), considerando redução do tempo de ciclo (24 - 8h) e o aumento da COV ( $4,11 - 12,33 \text{ kgDQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ ). Os reatores foram comparados a um reator controle, contendo apenas lodo e água residuária sintética ( $4,1 \text{ gDQO L}^{-1}$ ). A maior produção de metano (43%) e eficiências de remoção de matéria orgânica (80%) e de conversão de etanol e acetato ( $> 50\%$ ) foram obtidas nos reatores com adição de materiais condutivos, com produção de até  $160 \text{ mLCH}_4\text{h}^{-1}$  no reator com adição de biocarvão ( $12,33 \text{ kgDQO m}^{-3}\text{d}^{-1}$ ). Após a remoção dos materiais condutivos dos reatores, a produção de metano foi reduzida em até 50%.

Notou-se que os indicadores de desempenho do AnSBBR metanogênico nos ensaios com BC mantiveram-se constantes apesar do incremento da carga orgânica e da redução do tempo de ciclo, apresentando elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica, sugerindo a adaptação dos microrganismos às diferentes condições operacionais testadas. Esse desempenho está relacionado à capacidade do biocarvão em estimular a DIET, que possibilita melhor aproveitamento dos metabólitos pelos microrganismos sintróficos, e como consequência, aumenta a conversão de acetato em  $\text{CH}_4$  (CHEN et al., 2014; LUO et al., 2015; ZHAO et al., 2015). A presença de grupos funcionais contendo oxigênio alifático ( $-\text{CO}$ ) e alcano ( $-\text{CH}$ ), bem como grupos como quinona e fenazina aliados à porosidade e à superfície rugosa do BC, favorecem a transferência de massa entre substrato e microrganismos, colaborando para maiores eficiências de remoção de matéria orgânica e produção de metano (CAI et al., 2016; LÜ et al., 2016). Dessa forma, o BC beneficia as interações entre bactérias e arqueas metanogênicas, que se associam na superfície do biocarvão, promovendo a troca de elétrons entre os grupos microbianos e a predominância de grupos específicos da população metanogênica durante o processo de codigestão (GIWA et al., 2019; WANG et al., 2021), conforme será discutido no item 5.5.4.

Em reatores anaeróbios operados com baixos tempos de ciclo ( $< 8 \text{ h}$ ), eficiências de remoção de matéria orgânica superiores a 85% são pouco reportadas na literatura. Mari et al. (2020) em um sistema operado em duas fases utilizando ARFM como substrato (COV 12

$\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) alcançaram 60% de eficiência de remoção de matéria orgânica com tempo de ciclo de 6 h. De acordo com os autores, a baixa eficiência esteve atrelada ao aumento na concentração de metabólitos ( $> 1500 \text{ mg L}^{-1}$ ) ao final da operação. No presente estudo, para a operação do reator metanogênico em condições com elevada carga orgânica volumétrica aplicada ( $16 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e tempo de ciclo reduzido (6 h), a adição de biocarvão manteve o desempenho operacional do reator metanogênico, sem acúmulo de ácidos ao longo do tempo, possibilitando elevada eficiência de remoção de matéria orgânica e elevada produção de metano, conforme será discutido no item 5.5.3.

Considerando o aumento das COVs de 8, 12 e  $16 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a variação na eficiência de remoção de matéria orgânica, houve uma redução gradual da  $\text{COV}_R$  para  $7,5\pm 0,5$ ;  $10,6\pm 0,8$  e  $13\pm 0,6 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , nos ensaios V, VI e VII, respectivamente. O aumento da  $\text{COE}_A$  foi proporcional ao aumento da COV, observando-se praticamente os mesmos valores reportados nos ensaios da Fase III ( $0,65\pm 0,02$ ;  $1,01\pm 0,9$  e  $1,35\pm 0,6 \text{ gDQO gSTV}^{-1}\text{d}^{-1}$ ). A  $\text{COE}_R$  manteve-se em  $0,654\pm 0,04$ ;  $0,90\pm 0,02$  e  $1,14\pm 0,04 \text{ gDQO gSTV}^{-1}\text{d}^{-1}$  para os ensaios V, VI, e VII, respectivamente, reforçando que os microrganismos foram capazes de se adaptar às condições testadas.

### 5.5.3 Efeito da adição de biocarvão na produção de metano

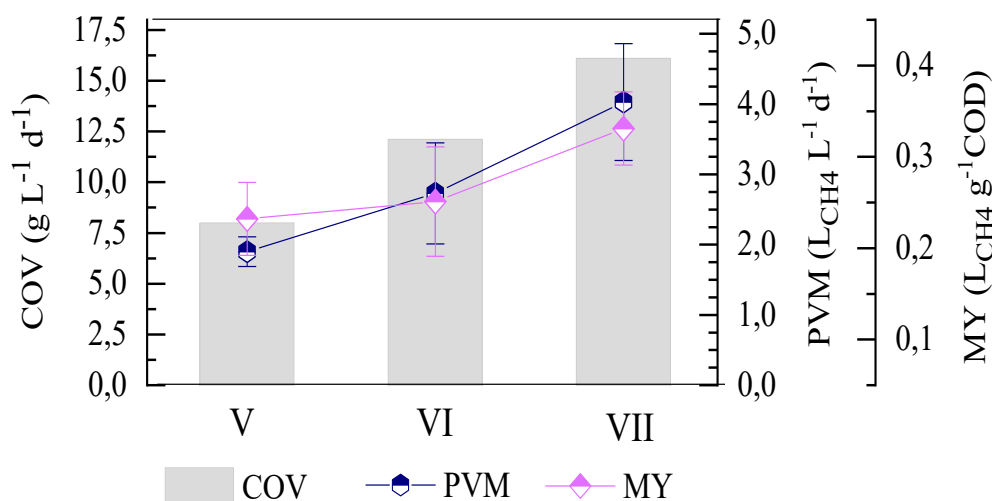
A adição de  $2 \text{ g L}^{-1}$  de BC no reator metanogênico proporcionou aumento na produção e rendimento de metano em comparação aos ensaios da Fase III, conforme apresentado na Tabela 28. O aumento da COV e a diminuição do tempo de ciclo proporcionaram aumento gradual da produção e rendimento de metano. Os teores de metano nos ensaios da Fase V mantiveram-se acima de 82%, alcançando 88% no ensaio V. A adição de biocarvão no reator metanogênico provocou um incremento médio de 26% na produção volumétrica e rendimento de metano em comparação aos ensaios da Fase III, resultando em PVM entre 1,84 - 4,06  $\text{LCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e MY entre 0,232 - 0,301  $\text{LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$ , para os ensaios V – VII. Nota-se que para a maior COV ( $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) e menor TC (6 h), a adição de biocarvão provocou um aumento de 20% no teor de  $\text{CH}_4$  e de 23% na PVM e MY, aumentando de  $3,74\pm 0,72 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $0,270\pm 0,05 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$  (ensaio IV) para  $4,06\pm 0,83 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $0,301\pm 0,04 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$  (ensaio VII).

**Tabela 28** - Desempenho do reator AnSBBR em relação à produção de metano antes e depois da adição de BC.

Parâmetros	Fase III (sem BC)				Fase V (com BC)	
	II	III	IV	V	VI	VII
COV (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	8	12	16	8	12	16
Teor de CH <sub>4</sub> no biogás (%)	74±3	69±7	65±6	86±4	85±5	82±6
	<b>78</b>	<b>73</b>	<b>69</b>	<b>88</b>	<b>87</b>	<b>85</b>
PVM (LCH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	1,48±0,4	2,31±0,81	3,74±0,72	1,84±0,21	2,73±0,72	4,06±0,83
	<b>1,57</b>	<b>2,71</b>	<b>3,94</b>	<b>2,1</b>	<b>3,11</b>	<b>4,43</b>
MY <sub>A</sub> (LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup> )	0,182±0,03	0,199±0,08	0,270±0,05	0,232±0,04	0,244±0,06	0,301±0,04
	<b>0,199</b>	<b>0,220</b>	<b>0,285</b>	<b>0,261</b>	<b>0,282</b>	<b>0,331</b>
MY <sub>R</sub> (LCH <sub>4</sub> gDQO <sup>-1</sup> )	0,178±0,06	0,179±0,03	0,253±0,08	0,215±0,02	0,223±0,2	0,263±0,2
	<b>0,188</b>	<b>0,197</b>	<b>0,277</b>	<b>0,245</b>	<b>0,248</b>	<b>0,293</b>
TPE (kJ L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	53,28±4,1	83,16±8,1	134,6±7,1	66,24±9,3	98,28±5,4	146,76±3,1

\*Valores corrigidos para condições normais de temperatura e pressão (CNTP). Os valores máximos estão representados em negrito; MY<sub>A</sub>– Rendimento de metano em função da carga orgânica aplicada; MY<sub>R</sub>– Rendimento de metano em função carga orgânica removida; TPE – Taxa de produção energética.

No reator metanogênico do presente estudo, o substrato encontrava-se facilmente disponível aos microrganismos. É possível que a adição do BC tenha aumentado a velocidade das reações bioquímicas dos microrganismos, promovendo maior produção de metano em menos tempo (SUNYOTO et al., 2016). A Figura 36 apresenta a produção e rendimento de metano nos ensaios V, VI e VII.



**Figura 36** - Produtividade volumétrica e rendimento de metano por carga removida nos ensaios com adição de biocarvão.

Verificou-se que a adição de biocarvão otimizou a operação do reator metanogênico ao longo dos ensaios, mantendo elevado teor de metano no biogás (acima de 83%) entre todas as condições operacionais testadas. Zhao et al. (2015) observaram comportamento semelhante ao operar reatores UASB com adição de BC ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Ao aumentar a COV de  $4,11$  para  $12,33 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$  e reduzir o TC de 24 para 8 h, os autores verificaram aumento na taxa de produção de metano de  $20 \text{ mL h}^{-1}$  para  $160 \text{ mL h}^{-1}$ , enquanto as eficiências de remoção de matéria orgânica e conversão de metabólitos mantiveram-se acima de 80% e 50%, respectivamente.

A partir da produção volumétrica de metano, foi estimada a taxa de produção energética dos ensaios V ( $66,24 \text{ kJ L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), VI ( $98,28 \text{ kJ L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), e VII ( $146,76 \text{ kJ L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Para a PVM máxima ( $4,43 \text{ L}_{\text{CH}_4} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , ensaio VII), obteve-se a TPE máxima de  $159,48 \text{ kJ L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . A Tabela 29 apresenta as TPEs obtidas a partir de diferentes estudos considerando a produção de metano em sistemas de duas fases alimentados com a ARFM.

**Tabela 29** – Comparativo entre estudos de sistemas em duas fases quanto à produção energética.

Reator	TC CH <sub>4</sub> (h)	COV (gDQO L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	PVM CH <sub>4</sub> (LCH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	PVM H <sub>2</sub> (LH <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	TPE Total (kJ L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Referência
UASB	-	90	0,65	0,53	29,1	Intanoo et al. (2014)
UASB	12*	13,4	0,82	0,63	36,3	Chavadej et al. (2019)
AnSBBR	6	12	2,71	0,7	105,2	Mari et al. (2020)
AnSBBR	6	16	3,74	1,2	147,6	Ensaio IV
AnSBBR	6	16	4,06	1,2	159,1	Ensaio VII

AFBR: *Anaerobic fixed-bed reactor*; ARHF: *Anaerobic Horizontal Flow reactor*; UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket; AnSBBR – Anaerobic sequencing batch biofilm reactor; COV – Carga Orgânica Volumétrica; TC - Tempo de ciclo; \* Em TDH – Tempo de detenção hidráulica.

O ensaio VII apresentou a maior TPE em relação aos demais estudos citados na Tabela 29, indicando melhor aproveitamento energético da ARFM em um sistema anaeróbio de duas fases. De acordo com Chen et al. (2014), o uso de BC facilita a metanogênese para microrganismos que não podem utilizar o H<sub>2</sub> ou o formiato como carreadores de elétrons, como as bactérias do gênero *Geobacter*. Chen et al. (2014) avaliaram o uso de culturas de *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens* e *Methanosaeta barkeri* em um reator anaeróbio utilizando etanol (21 mmol) como substrato. Os autores verificaram que as bactérias da espécie *G. metallireducens* foram incapazes de fornecer elétrons para redução do etanol a metano em um período de 30 dias, em contrapartida, após a adição de 27 gbiocarvão L<sup>-1</sup>, os 21 mmol de etanol renderam aproximadamente 16 mmol de CH<sub>4</sub> no período de 10 dias. De acordo com Chen et al. (2014), os resultados sugeriram que o BC reduziu o tempo de adaptação entre os microrganismos e suas interações metabólicas, acelerando a produção de metano.

Na Tabela 30 são apresentados estudos que avaliaram o efeito da adição de biocarvão sobre a digestão anaeróbia de resíduos oriundos de diferentes fontes. Os estudos nessa área ainda são iniciais e a principal abordagem contempla a digestão anaeróbia de lodo anaeróbio ou restos de alimentos em ensaios conduzidos em batelada.

**Tabela 30** - Comparativo entre tipos de biocarvão, condições experimentais e principais resultados da adição de BC na digestão anaeróbia.

Sistema	Fonte do biocarvão	Parâmetros monitorados	Condições experimentais	Principais Resultados		Referência
				Impactos da adição de BC	Propriedades destacadas do BC	
DF*	Pinheiro	H <sub>2</sub> ; CH <sub>4</sub> ; fase lag	Substrato resíduos de pão (61,2 % SVT); Adição de BC: 8,3 – 33,3 g L <sup>-1</sup>	↑ produção de H <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> em 32,5 e 41,6%; ↓ fase lag em 36 e 41%	Manutenção do pH e alcalinidade; Meio suporte para biomassa; DIET	Sunyoto et al. 2016
UF*	Lodo da indústria de laticínios	CH <sub>4</sub> ; [AOV]; fase lag	Substrato: RIL (39 gDQOL <sup>-1</sup> ); adição de BC (0,1 a 10 g L <sup>-1</sup> )	↑ produção de CH <sub>4</sub> em 35%; ↓ fase lag; ↓ [AOV] em 75%	Manutenção do pH e alcalinidade Estrutura porosa	Jang et al. (2018)
UF*	Rama de macieira	CH <sub>4</sub> ; [AOV];	Substrato: RIL+ batata (3:1) e (12,5 %SVT); Adição de BC: 6,3 g L <sup>-1</sup>	↑ produção de CH <sub>4</sub> em 5,23 vezes; ↓ [AOV] em 83%	Meio suporte para biomassa; DIET	Chen et al. (2021)
UF*	Serragem	CH <sub>4</sub> ; [AOV];	Substrato: restos de alimentos e lodo anaeróbio (1:5) e 59,5% SVT; Adição de BC: 15 g L <sup>-1</sup>	↑ produção de CH <sub>4</sub> em 3 vezes; ↓ [AOV] em 79%	Manutenção do pH e alcalinidade; Meio suporte para biomassa; DIET	Sugiarto et al. (2021)
UF*	Palha de miscanthus;	CH <sub>4</sub> ; [AOV];	Substrato: restos de alimentos lodo anaeróbio (1:7) e 97%SVT; Adição de BC: 10 g L <sup>-1</sup>	↑ produção de CH <sub>4</sub> em 22%; ↓ [AOV] em 89%	Manutenção do pH e alcalinidade; DIET	Johnravindar et al. (2021)
UF*	Palha de milho	CH <sub>4</sub> ; [AOV]; fase lag	Substrato: ARFRM (33, gDQO L <sup>-1</sup> ); Adição de BC: 1,5 g L <sup>-1</sup>	↓ fase lag em 22% ↓ [AOV] em 89%	Manutenção do pH e alcalinidade	Achi et al. (2021)
DF	Rama de mandioca e lodo anaeróbio	CH <sub>4</sub> ; [AOV];	Substrato: ARFM Adição de BC: 2 g L <sup>-1</sup>	↑ produção de CH <sub>4</sub> em 25%; ↓ [AOV] em 85%	Manutenção do pH e alcalinidade; Meio suporte para biomassa DIET;	Este trabalho

\* Ensaio realizados em frascos em batelada simulando reatores anaeróbios. UF: Única fase; DF: duas fases; RIL –Resíduo da indústria de laticínios; ARFRM: água residuária de farinha de mandioca; [AOV]; concentração de ácidos orgânicos voláteis; RSM: resíduos sólidos municipais; ARS: Água residuária sintética

Tendo em vista os estudos compilados na Tabela 30, observa-se que as principais propriedades do BC mencionadas na literatura são: i) manutenção do pH e alcalinidade; ii) sua função como meio suporte, devido à ampla área superficial e a estrutura porosa; iii) estímulo à DIET. Sunyoto et al. (2016) obtiveram aumento de 36,5 % e 41,6% na taxa de produção de hidrogênio e metano ao adicionar 16 gbiocarvão L<sup>-1</sup> em um sistema anaeróbio em duas fases. Jang et al. (2018) analisaram a adição de diferentes concentrações de biocarvão (0,1 – 10,0 g L<sup>-1</sup>) utilizando lodo da indústria de laticínios (30,4 gDQO L<sup>-1</sup>) como substrato. Os autores verificaram aumento de 35% na produção de metano com a adição de 10 gbiocarvão L<sup>-1</sup> e atribuíram esse desempenho à estrutura porosa e área superficial (6,23 m<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>) do BC, além da capacidade de manutenção do pH na faixa de 7,5 – 8, ideal para as arqueas metanogênicas. Chen et al. (2021) analisaram a produção de metano a partir da codigestão de lodo da indústria de laticínios e resíduos de batata, observando um aumento de 5,26 vezes na taxa de produção de metano após a adição de 6,3 gbiocarvão L<sup>-1</sup>. De acordo com os autores, a adição do BC estimulou o crescimento do filo *Bacteroidetes*, que inclui bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas para degradação da estrutura lignocelulósica da batata, e das arqueas do gênero *Methanosaeta*, envolvidas na DIET com algumas espécies de bactérias acetogênicas. Sugiarto et al. (2021) obtiveram produção de até 189,7 mLCH<sub>4</sub> gSVT<sup>-1</sup> na digestão anaeróbia de restos de alimentos (59% SVT) com adição de 15 gbiocarvão L<sup>-1</sup> e destacaram que a área superficial de 123 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> do BC possibilitou adesão e crescimento dos microrganismos em sua estrutura. Johnravindar et al. (2021) obtiveram rendimento de até 307 mLCH<sub>4</sub> gSVT<sup>-1</sup> na codigestão anaeróbia de restos de alimento e lodo anaeróbio com adição de 10 gbiocarvão L<sup>-1</sup>. Para os autores, o BC possibilitou a estabilidade operacional do sistema, com eficiências de 89% na conversão de metabólitos, gerando um digestato rico em macro e micronutrientes. Achi et al. (2021) analisaram a DA de água residuária de farinha de mandioca (33,7 gDQO L<sup>-1</sup>) em testes em batelada com adição de 3 gbiocarvão gSVT<sup>-1</sup>. De acordo com os autores, embora a produção de metano tenha sido 5% superior para o reator controle, no acumulado de 48 dias, a adição de BC ocasionou redução de 22% na duração da fase lag. É esperado que a concentração biocarvão varie em função dos substratos e condições operacionais estabelecidas para cada pesquisa. Por se tratar de uma área recente, ainda são necessários estudos aprofundados sobre o tema, que enfoquem a adição de biocarvão em sistemas de duas fases, diferentes configurações de reatores, incluindo reatores com biomassa imobilizada, além do uso de substratos complexos.

### 5.5.4 Efeito da adição de biocarvão na degradação da rama de mandioca e na comunidade microbiana

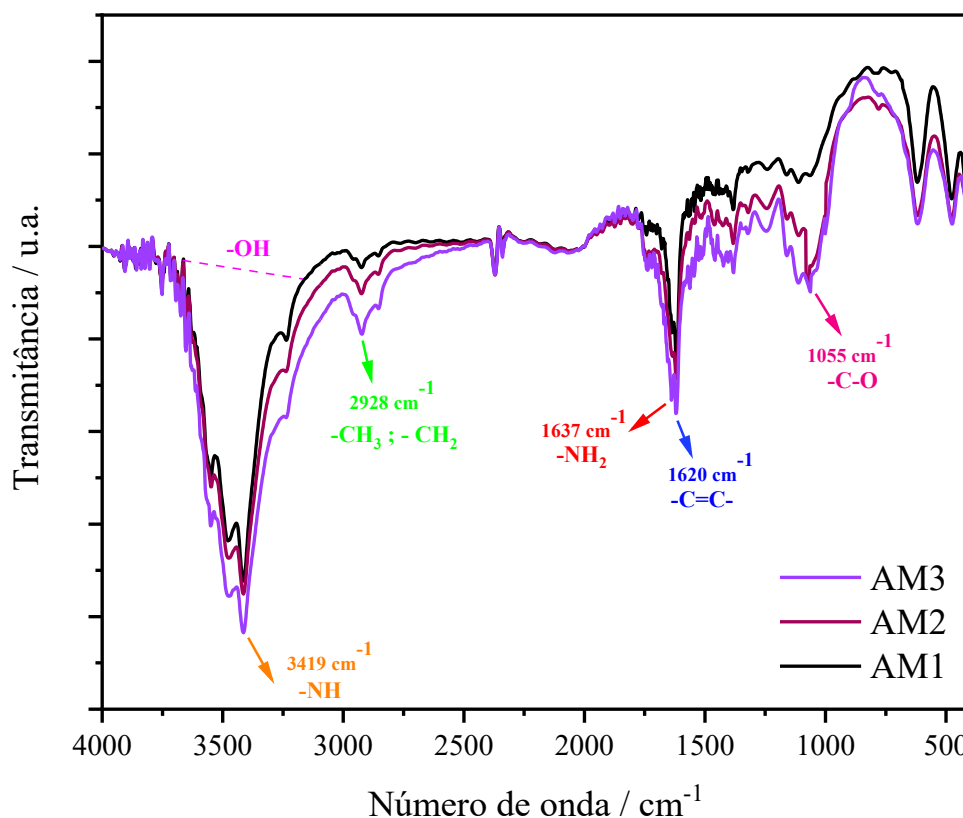
A adição de BC no reator metanogênico estimulou a degradação das ramas de mandioca, adicionadas como material suporte, além de aumentar a adesão dos microrganismos à estrutura da CS (Tabela 31).

**Tabela 31** - Composição da CS in natura e ao término dos ensaios V ao VII\*.

	Degradação da estrutura lignocelulósica			Proteína (mg g <sup>-1</sup> )
	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	
CS <i>in natura</i>	-	-	-	1,8
V	2	15	7	6,1
VI	3	24	11	9,8
VII	4	30	15	14,6

\*O mesmo material suporte foi usado ao longo dos ensaios V, VI e VII.

A adição de BC promoveu o aumento de aproximadamente 16% no teor de proteínas e de 18% na degradação da estrutura celulósica da rama de mandioca em comparação aos ensaios da Fase III. Foi reportado na literatura que a adição de materiais condutores favorece a predominância de bactérias capazes de degradar compostos aromáticos e lignocelulósicos, como os filos *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, otimizando a utilização de cosubstratos lignocelulósicos durante a digestão anaeróbia (LIU et al., 2017; WANG et al., 2021b). Saif et al. (2021) analisaram a codigestão de lodo anaeróbio e palha de arroz (20 g L<sup>-1</sup>) com a adição de 2g biocarvão L<sup>-1</sup>. De acordo com os autores, em comparação ao grupo controle, a adição de biocarvão promoveu o aumento de 87,55% no volume de biogás. O aumento da produção foi atribuído ao estabelecimento do filo *Proteobacteria*, responsável pela degradação da celulose e dos ácidos orgânicos, favorecendo a produção de metano. Na Figura 37 é apresentada a caracterização dos grupos funcionais presentes em amostras da rama de mandioca *in natura* (AM1), ao final da operação do AnSBBR metanogênico na Fase III (AM2) e ao final da operação do AnSBBR metanogênico na Fase V (AM3).



**Figura 37** - a) Análise dos grupos funcionais por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da CS in natura (AM 1), ao final da Fase III (AM 2) e ao final da fase V (AM 3).

A estrutura das ramas de mandioca, utilizadas como material suporte no reator metanogênico, apresentou comportamento semelhante ao observado nos ensaios acidogênicos da Fase II (Figura 15 item 5.2). Foi verificado que os principais alongamentos em comprimentos de onda foram mantidos, sem formação de novos sinais, indicando que a composição da CS não foi alterada. No entanto, o aumento da intensidade dos sinais nas amostras AM2 (reator metanogênico, Fase III) e AM3 (reator metanogênico, Fase V), mostra que a estrutura lignocelulósica foi modificada. Os principais grupos funcionais verificados em  $1055\text{-}1105\text{ cm}^{-1}$  (-C-O) são referentes a celulose, hemicelulose e lignina, enquanto o alongamento em  $1620\text{ cm}^{-1}$  (-C=C-) está relacionado aos anéis aromáticos da lignina (YUAN et al., 2010; LIU et al., 2020). O aumento da adesão de microrganismos presentes na CS no término de operação do reator na Fase V, foi identificado a partir do alongamento do grupo amina (-NH<sub>2</sub>) em  $1637\text{ cm}^{-1}$ , enquanto o alongamento entre  $3500\text{-}3350\text{ cm}^{-1}$  está relacionado ao grupo hidroxila (-OH) presente na estrutura da celulose (WIJITKOSUM e SRIBURI, 2021). O aumento da intensidade dos sinais da amostra AM3 indica maior degradação da celulose, hemicelulose e lignina na amostra de rama de mandioca do ensaio VII, sugerindo que o biocarvão pode ter estimulado a codigestão desse material ao longo dos ensaios.

Aliado à degradação das CS, verificou-se o incremento da concentração de metais que são essenciais ao desenvolvimento da comunidade microbiana no efluente do reator metanogênico (Tabela 32). Os resultados da Fase V indicam um aumento de aproximadamente 10% na concentração de micro e macronutrientes em comparação aos resultados da Fase III.

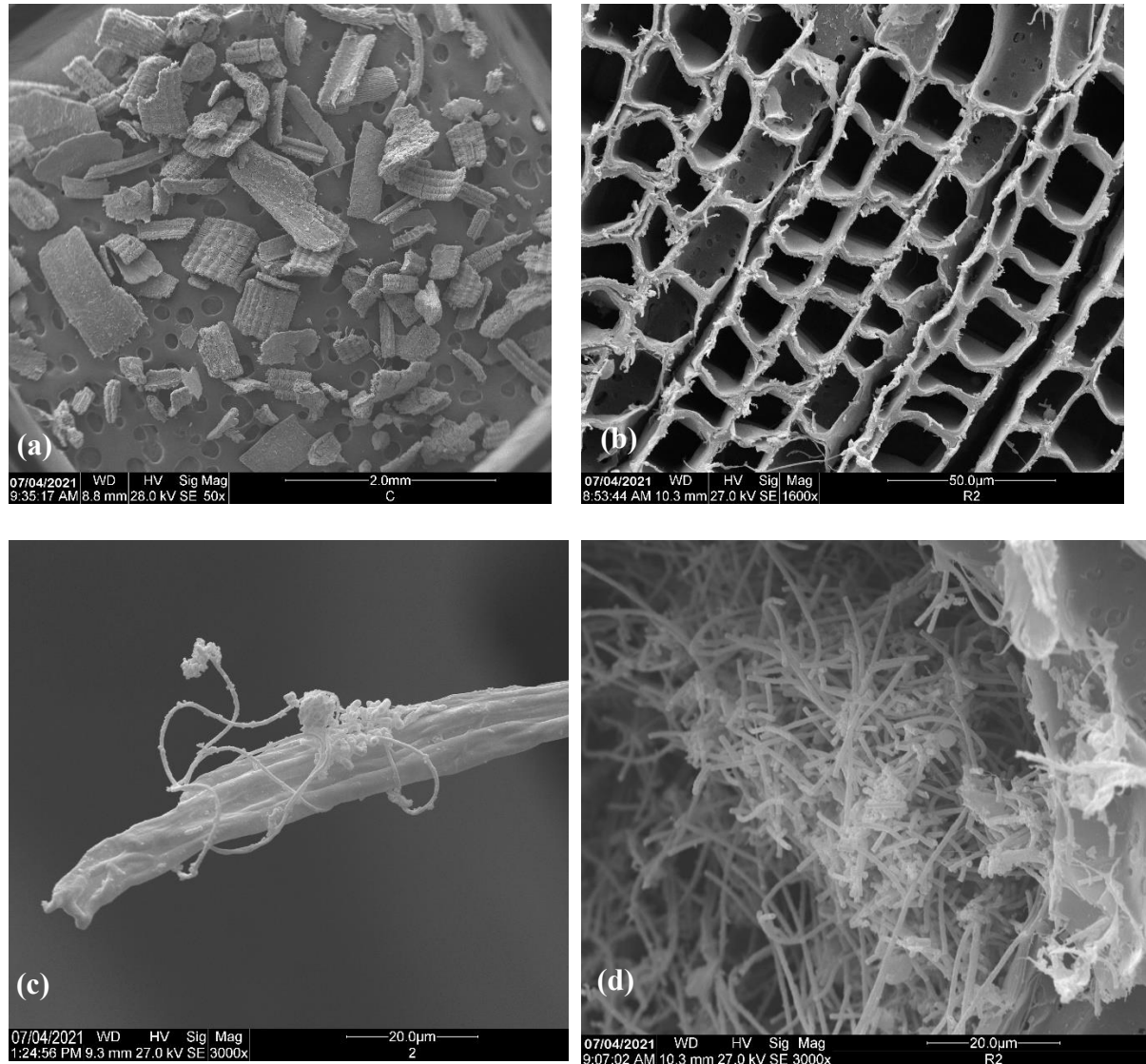
**Tabela 32** – Concentração de nutrientes presentes no efluente dos reatores das Fases II, III e V.

Oligoelementos (mg L <sup>-1</sup> )	ARFM	Fase II*	Fase III**	Fase V**
Fe <sup>2+</sup>	4,0±2,1	4,9±1,3	6,2±3,4	6,9±2,7
K <sup>+</sup>	409±83	521±58	684±132	752±88
Ni <sup>2+</sup>	0,03±0,01	0,1±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1
Mn <sup>2+</sup>	0,5±0,3	0,6±0,1	0,7±0,1	0,8±0,1
Cu <sup>2+</sup>	N.D.	0,09 ±0,02	0,2±0,04	0,3±0,07

\* Efluente do reator acidogênico; \*\* Efluente do reator metanogênico

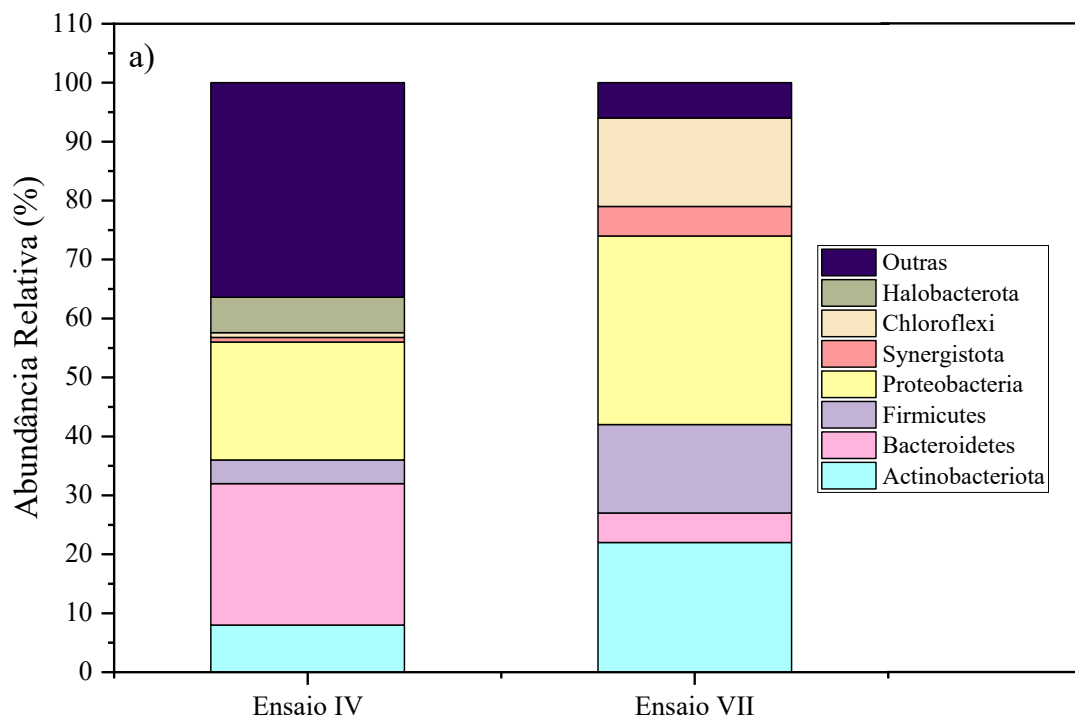
Embora o acréscimo na concentração de K<sup>+</sup> possa estar relacionado à composição do biocarvão (item 5.4.1), o aumento da concentração de micro e macronutrientes no efluente do reator metanogênico da Fase V esteve diretamente relacionado à degradação do material lignocelulósico, conforme observado nos ensaios anteriores (Fases II e III). Na Fase V, a degradação de 30% das ramas de mandioca, provocou aumento da concentração de oligoelementos no meio, o que também pode ter contribuído para maior produção de metano. Na literatura, o aumento na concentração de metais e oligoelementos no efluente de reatores metanogênicos foi reportado durante a codigestão de materiais lignocelulósicos após a adição de biocarvão. Saif et al. (2021) avaliaram a codigestão de lodo anaeróbico com palha de arroz e notaram aumento de até 8% na concentração de metais e de 87% na produção de metano, após a adição de 2 g L<sup>-1</sup> de BC ao processo. Johnravindar et al. (2021) verificaram que durante a codigestão anaeróbia de restos de alimento e lodo anaeróbico houve um aumento de aproximadamente 30% nas concentrações de K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup>, após a adição de 10 gbiocarvão L<sup>-1</sup> ao afluente. De acordo com os autores, esses elementos atuam como cofatores de enzimas que são essenciais à digestão anaeróbia, que contribuíram com o aumento do rendimento de 241 para 307mLCH<sub>4</sub> gSVT<sup>-1</sup>. Além disso, o incremento desses metais no efluente, enriquece o digestato que posteriormente pode ser utilizado como fertilizante.

Nos ensaios V – VII, o aumento da biomassa aderida foi observado a partir da relação biomassa/ meio suporte, que se manteve em 0,29 - 0,33 g<sup>-1</sup>SVT g<sup>-1</sup>suporte, valores 25% maiores aos obtidos nos ensaios da Fase III (0,2 – 0,23 g<sup>-1</sup>SVT g<sup>-1</sup>suporte). Na Figura 38 é possível identificar a estrutura do biocarvão e dos microrganismos aderidos ao material suporte.



**Figura 38** – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV): a) biocarvão; b) estrutura do biocarvão; c) estrutura filamentosa aderida ao biocarvão; d) microrganismos aderidos ao material suporte ao final do ensaio VII.

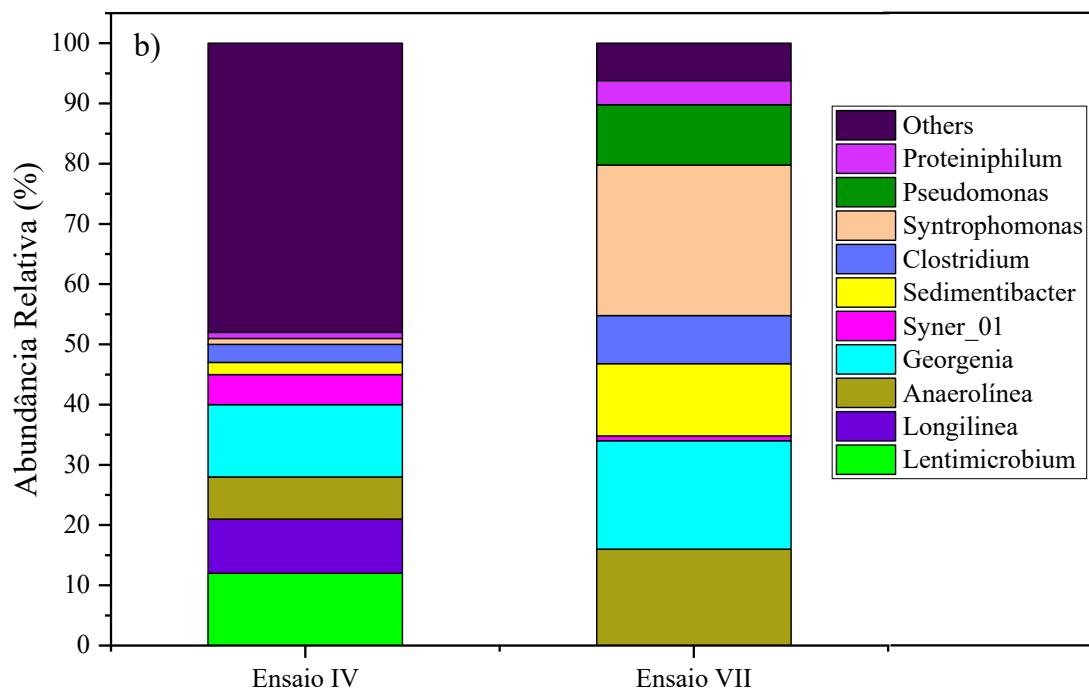
O biocarvão aderiu-se à CS utilizada na imobilização celular do reator metanogênico e sua estrutura porosa também favoreceu a fixação de microrganismos. Em todos os ensaios da Fase V houve predominância de estruturas filamentosas semelhantes às arqueas metanogênicas pertencentes ao gênero *Methanosaeta*. A análise metagenômica possibilitou identificar os principais filos (Figura 39) e gêneros (Figura 40) de bactérias e de arqueas presentes no reator metanogênico ao final da operação dos ensaios IV e VII. Assim como reportado no item 5.4, a adição de BC ao reator provocou uma redução de 82% na diversidade microbiana, ocasionando aumento na abundância relativa de microrganismos pertencentes aos filos *Proteobacteria* (30%), *Actinobacteriota* (22%), *Chloroflexi* (15%), *Firmicutes* (15%), *Spirochetes* (7%), *Bacteroidetes* (4%) e *Synergistota* (4%).



**Figura 39** – Abundância relativa das bactérias em relação ao filo ao final do ensaio IV (sem BC) e VII (com BC).

No ensaio VII a adição de biocarvão proporcionou aumento de 90%, 80% e 73% na abundância dos microrganismos que compõem os filos *Chloroflexi* (gênero *Anaerolinea*), *Synergistota* (gênero *Syner\_01*) e *Actinobacteriota* (gênero *Georgenia*), respectivamente, e que estão associados à degradação de substâncias complexas e de metabólitos intermediários (SHEN et al., 2017; MA et al., 2019). O filo *Proteobacteria*, cujas espécies promovem a degradação de celulose e proteína, além de estarem envolvidas na degradação sintrófica de ácidos orgânicos (MA et al., 2019, SAIF et al., 2021), apresentou abundância relativa 37% maior no ensaio VII. A presença do filo *Firmicutes* (gênero *Clostridium* e *Sedimentibacter*) foi observada em ambos os ensaios, o que pode estar relacionado à presença das ramas de mandioca no reator, uma vez que contempla espécies de microrganismos fermentativos. No entanto, em reatores metanogênicos operados em sistemas de duas fases, esses microrganismos também foram associados à degradação de ácidos de cadeias curtas em associação com as arqueas metanogênicas (SHEN et al., 2017 e ZHAO et al., 2017).

Em relação aos gêneros de bactérias presentes ao final do ensaio VII (Figura 40), houve predominância de *Syntrophomonas* (25%), *Georgenia* (18%), *Anaerolineas* (16%), *Sedimentibacter* (12%), *Pseudomonas* (10%) e *Clostridium* (8).



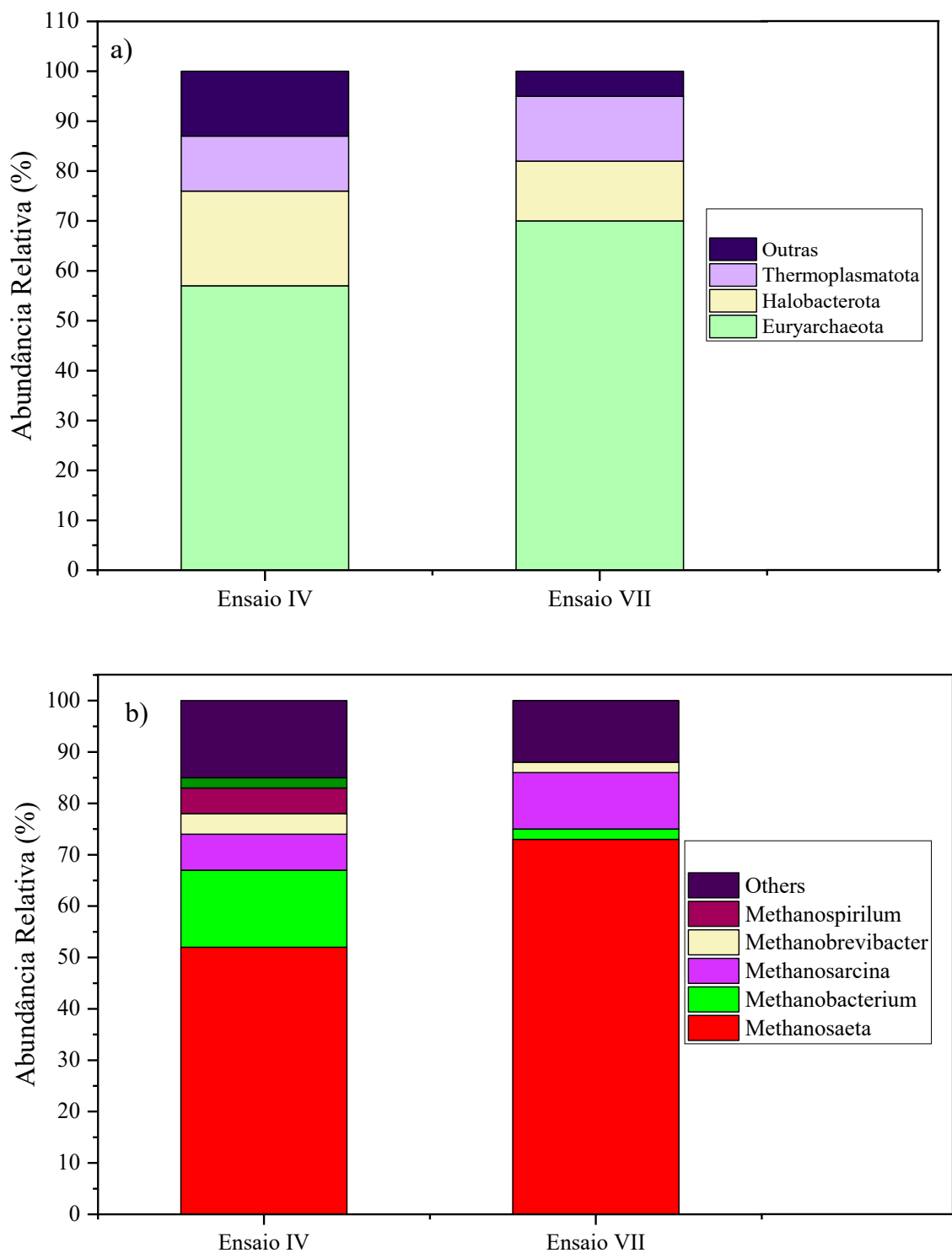
**Figura 40** – Abundância relativa das bactérias em relação ao gênero ao final do ensaio IV (sem BC) e VII (com BC).

A abundância do gênero *Georgenia*, pertencente ao filo *Actinobacteria*, aumentou 33% com a adição de biocarvão no ensaio VII. Esse gênero representa microrganismos capazes de degradar estruturas aromáticas e lignocelulósicas (NAKAMURA et al., 2014), como as ramas de mandioca utilizadas como material suporte. As enzimas celobiohidrolase, beta-glicosidase, pectina liase e ligninase são algumas das principais enzimas produzidas por esse grupo (WANG et al., 2016; WANG et al. 2021b), e podem ter contribuído com a degradação de até 30% da estrutura lignocelulósica observada ao final do ensaio VII. Os gêneros *Sedimentibacter*, *Anaerolineas*, *Pseudomonas*, *Proteiniphilum* totalizaram mais de 40% dos gêneros presentes ao final do ensaio VII, enquanto representaram menos de 18% no ensaio IV, no qual o gênero *Pseudomonas* representou menos de 1%. Na literatura os microrganismos pertencentes a esses gêneros são reconhecidos por sua capacidade de degradação de estruturas complexas e de ácidos orgânicos de cadeias longas (WANG et al., 2018b; SHEN et al., 2020; QI et al., 2021). O gênero *Proteiniphilum*, também pode estar associado à conversão do ácido propiônico em acetato (WANG et al., 2018b), o que pode ter contribuído para diminuir a concentração desse metabólito no ensaio VII. A adição de biocarvão aumentou em 62% a abundância de microrganismos do gênero *Clostridium*. Normalmente esse gênero está associado à fermentação de substratos ricos em carboidratos, mas, conforme mencionado anteriormente, também pode mediar a oxidação do acetato na presença de biocarvão (SHEN et al., 2017; CODIGNOLE LUZ et al., 2019). A abundância relativa do gênero *Syntrophomonas*, foi inferior a 1% ao final do

ensaio IV. No entanto, após a adição de biocarvão, esse valor aumentou em 96%. As bactérias do gênero *Syntrophomonas* são oxidantes de ácidos orgânicos à acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (ZANG et al., 2020; WANG et al., 2020; CHEN et al., 2021). No ensaio IV a abundância relativa dos gêneros *Longilinea* e *Lentimicrobium* foi de 10% e 8%, respectivamente. As bactérias pertencentes a esses gêneros são anaeróbias estritas que degradam compostos recalcitrantes e ácidos orgânicos de cadeia longa (YIN et al., 2019), que pode estar relacionado à elevada concentração de ácidos no efluente do ensaio IV (acima de 1500 mg L<sup>-1</sup>). Em contrapartida, no ensaio VII a abundância relativa desses gêneros foi inferior a 1%.

O incremento da abundância relativa de *Clostridium* e *Anaerolineas* em até 20% foi reportado por SHEN et al. (2017) após a adição de 4 g L<sup>-1</sup> de biocarvão em um sistema operado em duas fases utilizando como substrato restos de alimentos. De acordo com os autores, a interação desses microrganismos com os gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* estimulada a partir do biocarvão, possibilitou o acréscimo de 25% na produção de metano. Wang et al. (2018b) verificaram aumento de 30% dos microrganismos do gênero *Anaerolineas* após a adição de 15g L<sup>-1</sup> de BC. Esse gênero engloba bactérias capazes de transferir elétrons para aceptores como os microrganismos dos gêneros *Methanosaeta*, *Methanobacterium* e *Methanolinea* (WANG et al., 2018b; WANG et al., 2020; KHOEI et al., 2021). Codignole Luz et al. (2019), Baek et al. (2019) e Qi et al. (2021) reportaram que a adição de biocarvão na digestão anaeróbia pode favorecer a abundância das bactérias *Pseudomonas* em até 40%, uma vez que são microrganismos que degradam ácidos orgânicos em associação sintrófica com as *Methanosaetas*. Wang et al., (2020); Qi et al. (2021); Sugiarto et al., (2021); Saif et al., (2021); Wang et al., (2021a) reportaram o aumento da abundância relativa em mais de 50% do gênero *Syntrophomonas* a partir da adição de BC em digestores anaeróbios. Os microrganismos desse gênero são reconhecidos por seu metabolismo sintrófico de degradação de ácidos orgânicos em acetato e H<sub>2</sub> além da interação com arqueas acetoclásticas e hidrogenotróficas (ZHAO et al., 2017; CHEN et al., 2021).

Em relação à abundância relativa das arqueas metanogênicas, em ambos os ensaios houve predominância do filo *Euryarchaeota* e do gênero *Methanosaeta* (Figura 41a), mostrando que esses resultados são coerentes com as estruturas filamentosas identificadas na microscopia eletrônica de varredura.



**Figura 41** – Abundância relativa das arqueas em relação à: a) filo e b) gênero ao final do ensaio IV (sem BC) e VII (com BC).

Em comparação ao ensaio IV, a adição do biocarvão no ensaio VII possibilitou um aumento de 46% na abundância relativa do gênero *Methanosaeta* (Figura 41b). Observa-se que a abundância do gênero *Methanosarcina* foi de 7% e 11% nos ensaios IV e VII e, possivelmente, está associada a maior concentração de ácido acético (748 e 222 mg L<sup>-1</sup>,

respectivamente) em ambos os ensaios, o que favoreceu a via acetoclástica. Na presença do biocarvão, as arqueas desse gênero podem oxidar diferentes tipos de substrato (acetato, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, metanol, metilaminas), melhorando a produção de metano (LUZ et al., 2018; GIWA et al., 2019).

Era esperado que a metanogênese acetoclástica fosse a via dominante para a produção de CH<sub>4</sub> em ambos os ensaios, pois o substrato utilizado foi o efluente do reator acidogênico, composto principalmente pelo ácido acético. A redução de 50% da abundância dos gêneros *Methanospirillum* e *Methanobacterium* e o aumento na abundância das arqueas dos gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina* evidenciam que a adição de BC favoreceu as culturas acetoclásticas capazes de realizar a DIET (CHEN et al., 2014b; SHEN et al., 2020; QI et al., 2021). Dessa forma, como a descarboxilação do acetato e a redução do dióxido de carbono são vias essenciais para a produção de metano (BAEK et al., 2019; WANG et al., 2020), notou-se que o BC acelerou as reações bioquímicas de conversão dos metabólitos o que favoreceu o crescimento das arqueas acetoclásticas no reator metanogênico, que otimizaram o aproveitamento do substrato, produzindo até 4,06±0,83 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> no ensaio VII.

#### 5.5.5 Considerações finais da Fase V

Os resultados sugerem que a adição de biocarvão pode enriquecer a digestão anaeróbia com microrganismos eletroativos como bactérias *Anaerolineas*, *Syntrophomonas*, *Pseudomonas* e *Sedimentibacter* em conjunto com as arqueas *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. Esses dados indicam a vantagem do uso do biocarvão na DA em duas fases para condições de aumento de carga orgânica (8 – 16 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e redução do tempo de ciclo (12 – 6 h). A estrutura porosa do BC, composta em 37% de microporos e área superficial de 123,7 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, em conjunto com o material suporte (CS), favoreceu a fixação dos microrganismos e protegeu as arqueas metanogênicas das adversidades do meio, como o aumento da carga orgânica. Além disso, a presença de grupos funcionais hidroxila e a aromatização do BC proporcionaram capacidade de tamponamento e manutenção do pH na faixa ótima para os microrganismos metanogênicos (JANG et al., 2018; JOHNRAVINDAR et al. 2021). Essas propriedades do biocarvão aliadas ao estímulo à troca de elétrons entre os microrganismos presentes no reator possibilitou o aumento da velocidade da oxidação sintrófica de ácidos orgânicos. Dessa forma, a degradação de metabólitos e a eficiência de remoção de matéria orgânica se mantiveram elevadas, acima de 85% para todos os ensaios, inclusive para a maior carga orgânica (16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e menor tempo de ciclo (6 h) testados. Destaca-se a principal característica do biocarvão observada nesse estudo, a sua função redox-ativa, característica da presença de diferentes grupos funcionais,

como hidroxilas, alcanos, quinonas e fenazinas (SHANMUGAM et al., 2018; WANG et al., 2018; JOHNRAVINDAR et al. 2021), que estimularam a DIET entre os microrganismos predominantes no reator possibilitando rendimento e produção de metano de 0,301 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup> e 4,06 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

## 6. CONCLUSÕES

Baseando-se nos objetivos propostos e nos principais resultados do estudo de valorização energética dos resíduos do processamento da mandioca em sistema operado em duas fases, foi possível concluir:

- O pré-tratamento da rama de mandioca por hidrólise ácida proporcionou a redução da cristalinidade e o aumento da porosidade do material. Os resultados demonstram que os materiais lignocelulósicos são uma opção viável e sustentável para prover a imobilização de microrganismos em reatores anaeróbios e, ao mesmo tempo, atuarem como cosubstrato.
- No reator acidogênico alimentado com ARFM a colonização do material suporte foi evidenciada pelo aumento das relações PT/PLT no biofilme, que alcançaram valores médios entre 0,42 e 0,45. A codigestão das ramas, utilizadas na imobilização celular, colaborou para o balanceamento da concentração de nutrientes no meio, aumentando a disponibilidade de oligoelementos como  $\text{Fe}^{2+}$  ( $4,9 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{K}^+$  ( $521 \pm 58 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  ( $0,1 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  ( $0,6 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e  $\text{Cu}^+$  ( $0,09 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ).
- Ainda no reator acidogênico, o aumento da COV de 11 para  $15 \text{ gCarb L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a redução do TC de 4 para 3 h, associados à adição da CS como material suporte resultou em produção e rendimento de hidrogênio elevados, com valores máximos de  $1,48 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $1,98 \text{ molH}_2 \text{ kg}^{-1}\text{Carb}$ . Nessas condições foi observada a predominância dos gêneros produtores de hidrogênio *Hydrogenispora* e *Clostridium*. Ressalta-se a necessidade de verificar a viabilidade do uso da CS como material suporte em período superior ao deste estudo, uma vez que houve degradação de 36% da estrutura lignocelulósica da rama ao final do experimento.
- No AnSBBR metanogênico alimentado com o efluente do reator acidogênico o aumento da COV de 4 para  $16 \text{ gDQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e a diminuição do TC de 24 para 6 h, resultou em produção e rendimento máximos de  $3,94 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$  e  $0,285 \text{ LCH}_4 \text{ gDQO}^{-1}$ , com relação biomassa/meio suporte de  $0,23 \text{ g}^{-1}\text{SVT g}^{-1}\text{suporte}$ . Os resultados de produção e rendimento de metano elevados podem ser associados à divisão de fases da digestão anaeróbia e à suplementação de nutrientes importantes para o metabolismo dos microrganismos, proporcionada pela degradação das ramas hidrolisadas, que ocasionaram aumento de 30% na concentração dos oligoelementos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) presentes no efluente. Os resultados confirmaram a aplicabilidade da

digestão anaeróbia da ARFM em duas fases aliado ao uso das ramas de mandioca como material suporte e cosubstrato.

- Os testes com diferentes dosagens de biocarvão evidenciaram a capacidade de tamponamento e a condutividade elétrica do material. A aplicação da dosagem de 2,0 gbiocarvão L<sup>-1</sup> proporcionou produção de metano de 0,883±0,028 e 1,33 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> para as condições operacionais i (COV de 8 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 12 h) e ii (COV de 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 6 h), respectivamente. A adição do biocarvão proporcionou o enriquecimento da cultura microbiana com microrganismos eletroativos, confirmando a DIET.
- Nos ensaios do AnSBBR metanogênico aos quais o biocarvão foi adicionado, as propriedades redox-ativas do biocarvão aliadas ao aumento da COV (4 - 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) e à diminuição do TC (24 - 6 h), proporcionaram produção e rendimento máximos de 4,43 LCH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e 0,331 LCH<sub>4</sub> gDQO<sup>-1</sup>. A adição do biocarvão contribuiu com a codigestão das ramas de mandioca resultando na degradação de 30% do material suporte, o que colaborou com aumento de 40% da concentração de oligoelementos no efluente. Além disso, a presença de biocarvão ocasionou a seleção de microrganismos no reator metanogênico, favorecendo o estabelecimento de microrganismos eletroativos que realizam a doação de elétrons interespécies, principalmente arqueas acetoclásticas, como a *Methanosaeta* sp. Nos ensaios com adição de biocarvão a eficiência de remoção de matéria orgânica, a produção volumétrica e o rendimento de metano foram, em média, 26% maiores comparados aos ensaios sem biocarvão, confirmando que a adição do material condutor melhorou o desempenho do reator metanogênico.
- Considerando a melhor condição operacional do reator acidogênico (COV de 15 gCarb L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 3 h) e do reator metanogênico (COV de 16 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> e TC de 6 h) com adição de biocarvão, o sistema anaeróbio operado em duas fases com biomassa imobilizada em material lignocelulósico proveu uma taxa de produção de energia de 159,12 kJ L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A.A., TAVARES, F., ALVES, M.M., CAVALEIRO, A.J., PEREIRA, M.A. Garden and food waste co-fermentation for biohydrogen and biomethane production in a two-step hyperthermophilic-mesophilic process. **Bioresource Technology**, v.278, p. 180–186, 2019.

ACHI, C.G., HASSANEIN, A., LANSING, S., Enhanced Biogas Production of Cassava Wastewater Using Zeolite and Biochar Additives and Manure Co-Digestion, **Energies**, v. 13, p. 491, 2021.

ADEKUNLE, F. K.; OKOLIE, A.J.; A review of Biochemical Process of Anerobic Digestion, **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, p. 205-212, 2015.

AKINBOMI, J., WIKANDARI, R.T., AHERZADEH, M.J. Enhanced fermentative hydrogen and methane production from an inhibitory fruit-flavored medium with membrane-encapsuled cells. **Membrane** v.5, p. 616 -631, 2015.

AKYOL, Ç.; AYDIN, S.; INCE, O.; INCE, B. A comprehensive microbial insight into single-stage and two-stage anaerobic digestion of oxytetracycline-medicated cattle manure. **Chemical Engineering Journal**, v. 303, p. 675-684, 2016.

ALAVI, N., DANESHPAJOU, M., SHIRMARDI, M., GOUDARZI, G., NEISI, A., BABAEI, A.A. Investigating the efficiency of co-composting and vermicomposting of vinasse with the mixture of cow manure wastes, bagasse, and natural zeolite. **Waste Management**, v. 69, p.117-26, 2017.

ALBANEZ, R.; CHIARANDA, B.C., FERREIRA, R.G., FRANÇA, A.L.P., HONÓRIO, C.D., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M., Anaerobic Biological Treatment of Vinasse for Environmental Compliance and Methane Production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.178, p.21–43, 2016a.

ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by a co-digestion of vinasse and molasses. **International journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 20.473 – 20.484, 2016b.

ALGAPANI, D., QIAO, W., RICCI, M., BIANCHI, D., SIMON, M., ADANI, F., DONG, R. Bio-hydrogen and bio-methane production from food waste in a two-stage anaerobic digestion process with digestate recirculation, **Renewable Energy** v. 130, 2018.

AMERICAN PUBLIC HEATH ASSOCIATION - APHA. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Washington DC, American Public Health Association, 2012.

AMANI, T., NOSRATI, M., MOUSAVI, S.M., KERMANSHAHI, R.K. Study of syntrophic anaerobic digestion of volatile fatty acids using enriched cultures at mesophilic conditions. **Int. Journal of Environmental Science Technology** 8, 83–96, 2011.

AMORIM, E.L.C., BARROS, A.R., RISSATO, ZAMARIOLLI DAMIANOVIC, M.H., SILVA, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 783–790, 2009.

AMORIM, N. C.; AMORIM, E. L.; KATO, M. T.; FLORENCIO, L.; GAVAZZA, S. The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. **Biodegradation**, v. 29, n. 1, p. 41-58, 2018.

ANDREANI, C.L., TORRES, D.G.B., SCHULTZ, L., CARVALHO, K.Q., GOMES, S.D. Hydrogen production from cassava processing wastewater in an anaerobic fixed bed reactor with bamboo as a support material. **Eng. Agric.** v. 35, p.578-587, 2015.

ANDREANI, C. L.; TONELLO, T.U.; MARI, A.G.; LEITE, L. C.C.; CAMPANA, H.D.; LOPES, D.D.; RODRIGUES, J.A.D.; GOMES, S.D.; Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. **International journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 1474-1482, 2019.

ANGELIDAKI, I., ELLEGAARD, L., AHRING, B.K. A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 363–372, 2000.

ANGELIDAKI, I.; BOE, K.; ELLEGAARD, L. Effect of operating conditions and reactor configuration on efficiency of full-scale biogas plants. **Water Science Technology**, v. 52, p.188-194, 2005.

ANTONOPOULOU, G., STAMATELATOU, K., VENETSANEAS, N., KORNAROS, M., LYBERATOS, G. Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.47, p.5227–5233, 2008.

ANZOLA-ROJAS MP, FONSECA SG, SILVA CC, OLIVEIRA VM, ZAIAT M. The use of the carbon/nitrogen ration and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnol Rep.**, v. 5, p.46-54, 2015.

ANZOLA-ROJAS, M.P., ZAIAT, M., A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H<sub>2</sub> energy production from wastewater. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.91, p.1551-1561, 2016.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, p.152-161, 2005.

ARAÚJO, I. R. C. A.; GOMES, S. D.; TONELLO, T. U.; LUCAS, S. D. M.; MARI, A. G.; DE VARGAS, R. J. Methane production from cassava starch wastewater in packed-bed reactor and continuous flow. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v. 38, 2018.

ARIMI, M.M; KNODEL, J.; KIPROP, A.; NAMANGO, S.S; ZHANG, Y.; SVEN-UWE, G. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review; **Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 101-118, 2015.

ARREOLA-VARGAS, J., FLORES-LARIOS, A., GONZALES-ALVARES, V., CORONA-GONZALEZ, R.I., MENDÉZ-ACOSTA, H.O., Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse. **International journal of Hydrogen Energy**, 41, p. 897-904, 2016.

AWAD, Y.M., OK, Y.S., ABRIGATA, J., BEIYUAN, J., BECKERS, F., TSANG, D.C.W., RINKLEBE, J. Pine sawdust biomass and biochars at different pyrolysis temperatures change soil redox processes. **Sci. Total Environ.** v.625, p.147-154, 2018.

BAEK, G., KIM, J., KIM, J., LEE, C., Role and Potential of Direct Interspecies Electron Transfer in Anaerobic Digestion, **Energies**, v. 11, p. 108, 2018.

BAJPAI P. Structure of lignocellulosic biomass. Pretreatment Lignocellulosic Biomass Toward Biofuel Production. **Birefining of Biomass to Biofuel**, v.04, p. 203-221, 2016. 2017.

BANKS, C. J.; ZHANG, Y.; JIANG, Y.; HEAVEN, S. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 127–135, 2012.

BANU, R. J., GINNI, G., KAVITHA, S., YUKESH K. R., KUMAR A. S., BHATIA, S.K., KUMAR, G., Integrated biorefinery routes of biohydrogen: Possible utilization of acidogenic fermentative effluent. **Bioresource and Technology**, 319, 124241, 2021.

BASSIN, J.P.; DIAS, I.N.; CAO, S.M.S.; SENRA, E.; LARANJEIRA, Y.; DEZOTTI, M. Effect of increasing organic loading rates on the performance of moving-bed biofilm reactors filled with different support media: Assessing the activity of suspended and attached biomass fractions. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 100, p. 131-141, 2016.

BARROS, A.R.; AMORIM, E.L.C.; REIS, C.M.; SHIDA, G.M.; SILVA, E.L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 3379- 3388, 2010.

BARUA, S., DHAR, B.R., 2017. Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. **Bioresource and Technology**, v. 244, 698–707.

BAUER, C.G. AND FOREST, T.W.; Effect of hydrogen addition on the performance of methane-fueled vehicles. Part I. effect on S. I. engine performance. **Int. J. Hydrogen Energy**, v. 26, p. 55–70, 2001.

BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CANTO, C. S. A.; ZAIAT, M. Effect of Organic Load on the Performance and Methane Production of an AnSBBR Treating Effluent from Biodiesel Production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 165, p.347-68, 2011.

BECKERS, L., MASSET, J., HAMILTON, C., DELVIGNE, F., TOYE, D., CRINE, M., THONART, P., HILIGSMANN, S. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. **Biochem. Eng. Journal**. v.98, p.18–28, 2015.

BHATIA, S.K., JAGTAP, S.S., BEDEKAR, A.A., BHATIA, R.K., RAJENDRAN, K., PUGAZHENDHI, A., RAO, C.V., ATABANI, A.E., KUMAR, G., YANG, Y.H. Renewable biohydrogen production from lignocellulosic biomass using fermentation and integration of systems with other energy generation technologies, **Science of the total Environment**, v.765, p.144429, 2021.

BISAILLON A, TURCOT J, HALLENBECK PC. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. **Int J Hydrog Energy**, v.31, p.1504–8, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A.F.M., FERRAZ-JUNIOR, A.D.N., ZAIAT, M. Thermophilic biohydrogen production using a UASB reactor: performance during long-term operation. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 91, p.967-76, 2015.

BONCZ, M.A., FORMAGINI, E.L., SANTOS, L.S., MARQUES, R.D., PAULO, P.L., 2012. Application of urea dosing for alkalinity supply during anaerobic digestion of vinasse. **Water Sci. Technol**. V. 66, p. 2453-2460, 2015.

BOLIGON, J. **Produção e caracterização de carvão ativado a partir da borra de café solúvel**. 2015. 79 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

CABROL, L., MARONE, A., TAPIA-VENEGAS, E., STEYER, J.P., FILIPI, G.R., TRABLY, E., Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function, **FEMS Microbiology Reviews**, V. 41, p. 158–181, 2017.

CAI, J., HE, P., WANG, Y., SHAO, L., LÜ, F. Effects and optimization of the use of biochar in anaerobic digestion of food wastes. **Waste Manage Res**, 2016.

CALLAHAN, B.J., SANKARAN, K., FUKUYAMA, J.A. Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses, **F1000Research**, v.5, p. 1492, 2016.

CAMMATORA, M. C., 1998, **Produção de exopolímeros e adesão microbiana**. Tese de Doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CANILHA L, CHANDEL, A.K., MILESSI, T. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. V. 989572, 15 pages, 2012.

CANTO, C.S.A., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M., FORESTI, E. Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor (AnSBBR): Some Applications to Sanitary and Industrial Wastewaters. In: Theobald, R.H. (Ed.), **Environmental Management**. Nova Science Publishers, New York, 2008.

CASTRO, VILLALOBOS MC, GARCÍA-MORALES JL, FERNANDEZ FJ. Byproducts inhibition effects on bio-hydrogen production. **Int J Hydrogen Energy** v.37, p.7077-83, 2012.

CAO, G., REN, N., WANG, A., LEE, D.J., GUO, W., LIU, B., Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **Int J Hydrogen Energy**, v. 34:7182- 8, 2009.

CEPEA – CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Produção de fécula em 2020**. <https://www.cepea.esalq.usp.br>. Publicado em 2021. Acesso em 11 de outubro de 2021.

CHA, J. S., PARK, S.H., JUNG, S.C., RYU, C., JEON, J.K., SHIN, M.C., PARK, Y.K., Production and utilization of biochar: A review, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.40, p.1–15, 2016.

CHANDRA, R., TAKEUCHI, H. AND HASEGAWA, T. Methane Production from Lignocellulosic Agricultural Crop Wastes: A Review in Context to Second Generation of Biofuel Production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p. 1462-1476, 2012.

CHATTERJEE, B., MAZUMDER, D. Role of stage-separation in the ubiquitous development of anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste: a critical review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v. 104, p.439–469, 2019.

CHAVADEJ, S., WANGMOR, T., MAITRIWONG, K., CHAICHIRAWIWAT, P., RANGSUNVIGIT, P., INTANOO, P. Separate production of hydrogen and methane from cassava wastewater with added cassava residue under a thermophilic temperature in relation to digestibility, **Journal of Biotechnology**, 291, p. 61-71, 2019.

CHEN, W.H., TU, Y.J., SHEEN, H.K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Appl. Energy** v.88, p.2726–2734, 2011.

CHEN H. **Biotechnology of lignocellulose: theory and practice**, ed. 01, Springer, 210 p., 2014.

CHEN, S., ROTARU, A.E., SHRESTHA, P.M., MALVANKAR, N.S., LIU, F., FAN, W., NEVIN, K.P., LOVLEY, D.L., Promoting Interspecies Electron Transfer with Biochar, **Nature Scientific Reports**, v.5019, 2014.

CHEN, Y., YIN, Y., WANG, J., Influence of butyrate on fermentative hydrogen production and microbial community analysis. **Int J Hydrogen Energy**, v. 46, p. 26825, 2021.

CHENG, J., LIN, R., DING, L., SONG, W., LI, Y., ZHOU, J., CEN, K., Fermentative hydrogen and methane cogeneration from cassava residues: Effect of pretreatment on structural

characterization and fermentation performance. *Bioresource Technology*, v.179, p.407–413, 2015.

CHENG, T., LI, J., MA, X., ZHOU, L., WU, H., YANG, L., Alkylation modified pistachio shell-based biochar to promote the adsorption of VOCs in high humidity environment. *Environmental Pollution*, v. 295 p.118714, 2022.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores anaerobios**. 2 ed. Belo Horizonte: DESA-UFGM, 2016.

CONTRERAS-DÁVILA, C.A., MENDEZ-ACOSTA, H.O., ARELLANO-GARCIA, L., ALATRISTE-MONDRAGON, F., RAZO-FLORES, E. Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of *Agave tequilana* bagasse: effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, v. 313, p. 671–679, 2017.

CREMONEZ, P.A., TELEKEN, J.G., MEIER, T.R.W., ALVES, H.J., Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. *Journal of Environmental Management*, v.281, p.111854, 2021.

CRISPIM, S.M., NASCIMENTO, A.M.A., COSTA, P.S., MOREIRA, J.L.S., NUNES, A.C., NICOLI, J.R., LIMA, F.L., MOTA, V.T., NARDI, R.M.D. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with puba, a Brazilian fermented cassava food, **Braz. J. Microbiol.** v.44, p.15–21, 2013.

CODIGNOLE LUZ, F., CORDINER, S., MANNI, A., MULONE, V., ROCCO, V. Biochar characteristics and early applications in anaerobic digestion-a review. **J. Environ. Chemical Engineering**. 6, 2892–2909, 2018.

CORBARI, S.D.M.L., ANDREANI, C.L., TORRES, D.G.B., GOMES, S.D. Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. **Int J Hydrogen Energy**, v.44, p.17214-23, 2019.

CUBAS, S.A., FORESTI, E.; RODRIGUES, J.A.D; RATUSZNEI, S.M.; ZAIAT, M.; Effect of impeller type and stirring frequency on the behavior of an AnSBBR in the treatment of low-strength wastewater, **Bioresource technology**, v.102, pp.889-893, 2011.

DANG, Y., HOLMES, D.E., ZHAO, Z., WOODARD, T.L., ZHANG, Y., SUN, D., WANG, L.Y., NEVIN, K.P., LOVLEY, D.R. Enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with carbon-based conductive materials. **Bioresource Technol.** v..220, p.516–522, 2016.

DA SILVA, A.N., MACÊDO, W.V., SAKAMOTO, I.K., LOS ANGELES, D., PEREYRA, D.L.A.D., MENDES, C.O., MAINTINGUER, S.I., CAFFARO FILHO, R.A., DAMIANOVIC, M.H.Z., VARESCHE, M.B.A., AMORIM, E.L.C. Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. **Biomass Bioenergy**, v.120, p.257–264, 2019.

DAS, T. D., VEZIROGLU, N. Advances in biological hydrogen production processes, **International Journal of Hydrogen Energy**, V.33, Issue 21, p. 6046-6057, 2008.

DE VRIEZE, J., HENNEBEL, T., BOON, N., VERSTRAETE, W. Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. **Bioresource Technol.** v.112, p.1–9, 2012.

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL DO GOVERNO DO PARANÁ, **Prognóstico da Cultura da Mandioca, 2020**. Download a partir da página do Departamento de economia rural: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** em 12/10/2021.

DEUBLIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from waste** and renewable resources: an introduction. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination sugars and related substance. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

EDAMA, N.A., SULAIMAN, A., RAHIM, S.N.A. Enzymatic saccharification of Tapioca processing wastes into biosugars through immobilization technology. **Biofuel Research Journal**. v.1, p.2–6, 2014.

ELBESHISHY. E., DHAR. B.R., NAKHLA, G., LEE, H.S., A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.79, p.656–668, 2017.

EKER S, SARP M. Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: effects of initial substrate and biomass concentrations. **Int J Hydrog Energy**, v. 42, p. 2562–8, 2017.

ENITAN, A.M., KUMARI, S., SWALAHA, F.M., ADEYEMO, J., RAMDHANI, N., BUX, F. Kinetic modelling and characterization of microbial community present in a full-scale UASB reactor treating brewery effluent. **Microbiology Ecology**, v.67, p.358–368, 2014.

ERGal, I.; FUCHS, W.; HASIBAR, B.; THALLINGER, B.; BOCHMANN, G.; RITTMANN, S.K.-M.R.; The physiology and biotechnology of dark fermentative biohydrogen production. **Biotechnologies Advances**, v36, p. 2165 – 2186, 2018.

FAGBOHUNGBE, M.O., HERBERT, B.M., HURST, L., LI, H., USMANI, S.Q., SEMPLE, K.T., Impact of biochar on the anaerobic digestion of citrus peel waste. **Bioresour. Technol.** v.216, p.142–149, 2016.

FENG, K., WANG, Q., LI, H., ZHANG, Y., DENG, Z., LIU, J., DU, X. Effect of fermentation type regulation using alkaline addition on two-phase anaerobic digestion of food waste at different organic load rates. **Renewable Energy**, v. 154, p. 385–393, 2020.

FERRARA, F., ORSINI, A., PLAISANT, A., PETTINAU, A. Pyrolysis of coal, biomass and their blends: performance assessment by thermogravimetric analysis, **Bioresour. Technol.** 171 433–441, 2014.

FERRAZ – JUNIOR, A.D.N., WENZEL, A.D.N.F, ETCHEBEHERE, C., ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **Int. J. Hydrogen Energy**, v.39, p.16852–16862, 2014.

FERRAZ-JÚNIOR, A. D. N.; KOYAMA, M. H.; ARAÚJO JR, M. M.; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245-252, 2016.

- FERGUSON, R.M., COULON, F., VILLA, R. Organic loading rate: a promising microbial management tool in anaerobic digestion. **Water Research**. 100, 348–356, 2016.
- FERNANDES, B.S., PEIXOTO, G., ALBRECHT, F.H., AGUILA, N.K.S., ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v.14, p.143–148, 2010.
- FERNÁNDEZ, F., VILLASENOR J., INFANTES D., Kinetic and stoichiometric modelling of acidogenic fermentation of glucose and fructose. **Biomass Bioenergy**; v.35, p.3877-83, 2011.
- FERREIRA, L.R.A., OTTO, R.B., SILVA, F.P., DE SOUZA, S.N.M., DE SOUZA, S.S., ANDO JUNIOR O.H., Review of the energy potential of the residual biomass for the distributed generation in Brazil, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.94, p. 440-455, 2018a.
- FERREIRA, T.B., REGO, G.C., RAMOS, L.R., SOARES, L.A., SAKAMOTO, I. K., OLIVEIRA, L.L., VARESCHE, M.B.A., SILVA, E.L., Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors, **Int. J. Hydrogen Energy**, v.43, p.18908 – 18917, 2018b.
- FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG, E.; ANDRADE, M. A. M.; FRARE, L. M. Optimization of anaerobic treatment of cassava processing wastewater. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, n. 37, p. 574 – 590, 2017.
- FONTANA, A., CAMPANARO, S., TREU, L., KOUGIAS, P.G., CAPPALÀ, F., MORELLI, L., ANGELIDAKI, I. Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes. **Water Research**, v.134, 181–191, 2018.
- FOONG, S. Y., LATIFF, N.S.A., LIEW, R. K., YEK, P. N. Y., LAM, S.S., Production of biochar for potential catalytic and energy applications via microwave vacuum pyrolysis conversion of cassava stem, **Materials Science for Energy Technologies**, v. 3, 728–733, 2020.
- FU, S.-F., XU, X.-H., DAI, M., YUAN, X.-Z., GUO, R.-B. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v.107, p.81–86, 2017.
- FUESS, L.T., **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico- metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**, Tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.
- FUESS LT, MAZINE KIYUNA LS, GARCIA ML, ZAIAT M. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **Int J Hydrogen Energy**; v.41, p.8132–45, 2016.
- FUESS, L. T.; ARAÚJO JÚNIOR, M. M.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: how phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs? **Chemical engineering research and design**, v.119, p. 209-220, 2017a.

FUESS, L.T., KIYUNA, L.S.M., FERRAZ JÚNIOR, A.D., PERSINOTI, G.F., SQUINA, F.M., GÁRCIA, M. L., ZAIAT, M. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Appl. Energy**, v.189, p.480–491, 2017b.

FUESS LT, KLEIN BC, CHAGAS MF, REZENDE MCAF, GARCIA ML, BONOMI A, ZAIAT M. Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: an integrated technoeconomic and environmental approach. **Renew Energy**, v.122, p.674-87, 2018.

GAHLOT, P., AHMED, B., TIWARI, S.B., ARYAL, N., KHURSHEED, A., KAZMI, A.A., TYAGI, V.K. Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: mechanism and application. **Environmental Technology Innovation**, v.20, p. 101056, 2020.

GARCÍA- DEPRAECT, O., MUNOZ, R., LIER, J.V., Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production, **Bioresource Technology**, v. 307, p.123160, 2020.

GERARDI, M.H., **The microbiology of anaerobic digesters**, ed. John Wiley & Sons, 188 p., 2003.

GHIMIRE A, SPOSITO F, FRUNZO L, TRABLY E, ESCUDÉ R, PIROZZI F, Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. **Waste Management**, v.50, p. 55–64, 2016.

GIWA, A.S., HENG, X., CHANG, F., WU, J., LI, Y., ALI, N. Effect of biochar on reactor performance and methane generation during the anaerobic digestion of food waste treatment at long-run operations. **Journal Environ Chem Eng**, v.7, p.103067, 2019.

GRAHAN, D.E., WHITE, R.H., Elucidation of methanogenic coenzyme biosynthesis: from spectroscopy to genomics. **Natural Products report**, v.19, p. 133-147, 2002.

GOMES, B.C., ROSA, P.R.F., ETCHEBEHERE, C., SILVA, E.L., VARESCHE, M.B.A., Role of homo and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater, *Int. J. Hydrogen Energy*, v.40, p.8650–8660, 2015.

GÓMEZ, X.; FERNÁNDEZ, C.; FIERRO, J.; SÁNCHEZ, M.E.; ESCAPA, A.; MORÁN, A.; Hydrogen production: Two stage process for waste degradation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8621-8627, 2011.

GOKFILIZ P, KARAPINAR I. The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. **Int J Hydrogen Energy** v. 42, p.2553–61, 2017.

GONZALEZ-MARTINEZ A, GARCIA-RUIZ MJ, RODRIGUEZ-SANCHEZ A, OSORIO F, GONZALEZ- LOPEZ J. Archaeal and bacterial community dynamics and bioprocess performance of a bench-scale two-stage anaerobic digester. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.100, p.6013–33, 2016.

GRESES, S., GABY, J.C., AGUADO, D., FERRER, J., SECO, A., HORN, S.J. Microbial community characterization during anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. under mesophilic and thermophilic conditions. **Algal Res.** 27, 121–130, 2017.

GU, X. Y.; LIU, J. Z.; WONG, J. W. C. Control of lactic acid production during hydrolysis and acidogenesis of food waste. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 711–715, 2018.

GUL S, WHALEN JK, THOMAS BW, SACHDEVA V, DENG H. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: mechanisms and future directions. **Agric Ecosyst Environmental**, v. 206, p.46–59, 2015.

GUO, X., WANG, C., SUN, F., ZHU, W., WU, W. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. **Bioresource Technology**, v.152, p.420–428, 2014.

GUO, J., PENG, Y., NI, B.J., HAN, X., FAN, L., YUAN, Z. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. **Microb. Cell Fact.** V.14, p.33, 2015.

HAFEZ H, NAKHLA G, NAGGAR HE, ELBESHBISHY E, BAGHCHEHSARAE B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **Int J Hydrogen Energy**, v. 35, p.81-92, 2010.

HALLENBECK, P.C.; Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. **Water Science Technology.** 52, 21–29, 2005.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends Biotechnology**, v.27, p.287-297, 2009.

HAN W, NA D, WEN Y, HONG J, FENG Y, QI N. Biohydrogen production from food waste hydrolysate using continuous mixed immobilized sludge reactors. **Bioresource Technology**, v.180, p.54–8, 2015.

HASHEMI, S.; HASHEMI, S.E.; LIEN, K.M.; LAMB, J.J. Molecular Microbial Community Analysis as an Analysis Tool for Optimal Biogas Production. **Microorganisms**, v.9, p.1162, 2021.

HAWKES, F.R., HUSSY, I., KYAZZE, G., DINSDALE, R.; HAWKES, D.L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **Int. J. Hydrogen Energy** 32, 172–184, 2007.

HERNÁNDEZ, B.; MARTÍN, M., Optimal Process Operation for Biogas Reforming to Methanol: Effects of Dry Reforming and Biogas Composition, **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 55, p.6677-6685, 2016.

HILL, D.T., COBB, S.A., BOLTE, J.P., Using volatile fatty acid relationships to predict anaerobic digester failure. **Trans. ASAE.** 30(2), 496-501.

- HO, S.-H., CHEN, Y.-D., YANG, Z.-K., NAGARAJAN, D., CHANG, J.-S., REN, N.-Q. High-efficiency removal of lead from wastewater by biochar derived from anaerobic digestion sludge. **Bioresour Technology**, v.246, p.8, 2017.
- HOSSAIN, M.K., STREZOV, V., CHAN, K.Y., ZIOLKOWSKI, A., NELSON, P.F., Influence of pyrolysis temperature on production and nutrient properties of wastewater sludge biochar, **Journal of Environmental Management**. v.92, p.223–228, 2011.
- HU, C. C.; GIANNIS, A.; CHEN, C. L.; QI, W.; WANG, J. Y. Comparative study of biohydrogen production by four dark fermentative bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, p.15686-15692, 2013.
- HU, B.B., ZHU, M.J., Direct hydrogen production from dilute acid pretreated sugarcane bagasse hydrolysate using the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* MJ1. **Microb Cell Factories**, v.16, p. 77, 2017.
- HUANG, W.; SHE, Z.; GAO, M.; WANG, Q.; JIN, C.; ZHAO, Y.; GUO, L. Effect of anaerobic/aerobic duration on nitrogen removal and microbial community in a simultaneous partial nitrification and denitrification system under low salinity. **Science of the Total Environment**. v. 651, i. 1, p. 859-870, 2019.
- HUNG, C.H.; CHANG, Y.T.; CHANG Y.J.; Roles of microorganisms other than clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. **Bioresour Technology**, v. 102, p. 8437-8444, 2011.
- HUNT, J. D., NASCIMENTO, A., SCHWENGBER TEN CATEN, C., TOME, F.M.C., SCHNEIDER, P.S., THOMAZONI, A.L.R., CASTRO, N.J., BRANDÃO, R., FREITAS, M.A.V., MARTINI, J.S.C., RAMOS, D.S., SENNE, R., Energy crisis in Brazil: Impact of hydropower reservoir level on the river flow, **Energy**, v.239, p.1219-27, 2021.
- HWANG, M. H., JANG, N.J., HYUN, S.H., KIM, I.S., Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH, **Journal of Biotechnology**, v.111, p. 297–309, 2004.
- IFTHIKAR, J., WANG, T., KHAN, A., JAWAD, A., SUN, T., JIAO, X., CHEN, Z., WANG, J., WANG, Q., WANG, H., JAWAD, A., Highly efficient lead distribution by magnetic sewage sludge biochar: sorption mechanisms and bench applications. **Bioresour. Technol.**, 2017.
- INDREN, M., BIRZER, C.H., KIDD, S.P., HALL, T., MEDWELL, P.R. Effects of biochar parent material and microbial pre-loading in biochar-amended high-solids anaerobic digestion. **Bioresour. Technol.**, v. 298, p.122457, 2020.
- INTANOO, P., RANGSANVICH, P., MALAKUL, P., CHAVADEJ, S. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. **Bioresour. Technol.**, v. 173, 256–265, 2014.
- INTANOO, P., RANGSANVICH, P. CHAVADEJ, S., Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production, **Int. J. Hydrogen Energy**, v.41, p.6107-6114, 2016.

INOUE, R. K. **Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento na produção de biohidrogênio em ANSBBR com agitação tratando água residuária sintética**. 2013. 221 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2013.

INOUE, R. K.; LIMA, D. M. F.; RODRIGUES, J. A. D. RATUSZNEI, S. M., ZAIAT, M. . Effect of Organic Loading Rate and Fill Time on the Biohydrogen Production in a Mechanically Stirred AnSBBR Treating Synthetic Sucrose-Based Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 2326-2349, 2014.

ISLAM M.S., GUO C., LIU C.Z. Enhanced hydrogen and volatile fatty acid production from sweet sorghum stalks by two-steps dark fermentation with dilute acid treatment in between. **Int J Hydrogen Energy**, v.43, p. 659–66, 2018.

ISMAIL, N., FAUZI, N.F., SALEHABADI, A., LATIF, S., AWISZUS, S., MULLER, J., A study on biogas production from cassava peel and stem in anaerobic digestion reactor. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2021.

JHA, P.; SCHMIDT, S. Reappraisal of chemical interference in anaerobic digestion processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 954–971, 2017.

JANG HM, CHOI Y-K, KAN E. Effects of dairy manure-derived biochar on psychrophilic, mesophilic and thermophilic anaerobic digestions of dairy manure. **Bioresource Technology**, 2017.

JIANG, L., SONG, P., ZHU, L., LI, S., HU, Y., FU, N., HUANG, H., Comparison of metabolic pathway for hydrogen production in wild-type and mutant *Clostridium tyrobutyricum* strain based on metabolic flux analysis, **Int. J. Hydrogen Energy**, 38, 2176-2184, 2013.

JIANG, H.; QIN, Y.; GADOW, S. I.; OHNISHI, A.; FUJIMOTO, N.; LI, Y-Y. Bio-hythane production from cassava residue by two-stage fermentative process with recirculation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 769-775, 2018.

JIJAI, S., SRISUWAN, G., O-THONG, S., ISMAIL, N., SIRIPATANA, C. Effect of granule sizes on the performance of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for cassava wastewater treatment. **Energy Procedia**, v.79, p.90–97, 2015.

JIRAPRASERTWONG, A. MAITRIWONG, K., CHAVADEJ, S. Production of biogas from cassava wastewater using a three-stage upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, **Renewable Energy**, v.130, p.191-205, 2019.

JORAND, F.; ZARTARIAN, F.; THOMAS, F.; BLOCK, J.C.; BOTTERO, J.Y.; VILLEMIN, G.; VILLEMIN, G.; URBAIN, V.; MANEN, J. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. **Water Research**, v. 29, p. 1639-1647, 1995.

JOHNRAVINDAR, D., WONG, J.W.C., CHAKRABORTY, D., BODEDLA, G., KAUR, G. Food waste and sewage sludge co-digestion amended with different biochars: VFA kinetics, methane yield and digestate quality assessment. **Journal of Environmental Management**, v. 290, p.112457, 2021.

JÜRGENSEN, L., EHIMEN, E.A., NASCIDO, J., HOLM-NIELSEN, J. A combination anaerobic digestion scheme for biogas production from dairy effluent—CSTR and ABR, and biogas upgrading. **Biomass Bioenergy**, v. 111, p.241–247, 2018.

KAINTHOLA, J., KALAMDHAD, A.S., GOUD, V.V., A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. **Process Biochem.**, v.84, p.81–90, 2019.

KALIL MS, ALSHIYAB HS, YUSOFF WW. Effect of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio on hydrogen production using *C. acetobutylicum*. **American Journal of Biochemical Biotechnology**, v.4, p.393–401, 2008.

KAPDAN, I.K. AND KARGI, F., Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.569–582, 2006.

KARKI B, MAURER D, JUNG S. Efficiency of pretreatments for optimal enzymatic saccharification of soybean fiber. **Bioresource Technology**; v.102, p.6522- 8, 2011.

KARADAG D, MAKINEN AE, EFIMOVA E, PUHAKKA JA. Thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated-hot spring culture. **Bioresource Technology**; v.100, p.5790-5, 2009.

KHANAL, S.K.; CHEN, W.H., LI, L., SUNG, S., Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, **Int J Hydrogen Energy**, v.29, p.1123-1131, 2004.

KHOEI, S., STOKES, A., KIEFT, B., KADOTA, P., HALLAM, S.J., ESKICIOGLU, C. Biochar amendment rapidly shifts microbial community structure with enhanced thermophilic digestion activity. **Bioresource Technology**, V. 341, P. 125864, 2021.

KHONGKLIANG, P., KONGJAN, P., O-THONG, S. Hydrogen and methane production from starch processing wastewater by thermophilic two-stage anaerobic digestion. **Energy Procedia**, v.79, p.827–832, 2015.

KHONGKLIANG, P., KONGJAN, P., UTARAPICHAT, B., REUNGSANG, A., O-THONG, S., Continuous hydrogen production from cassava starch processing wastewater by two-stage thermophilic dark fermentation and microbial electrolysis, **Int J Hydrogen Energy**, v.42, 27584-27592, 2017.

KIZITO, S., WU, S., KIPKEMOI, K. W., LEI, M., LU, Q., BAH, H. Evaluation of slow pyrolyzed wood and rice husks biochar for adsorption of ammonium nitrogen from piggery manure anaerobic digestate slurry. **Science of Total Environment**, v.505, p.102–12, 2015.

KLINPRATOON, B., ONTANEE, A., RUANGVIRIYACHAI, C., Improvement of cassava stem hydrolysis by two-stage chemical pretreatment for high yield cellulosic ethanol production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 32:413-423, 2015;

KOBAYASHI T, XU K-Q, LI Y-Y, INAMORI Y. Effect of sludge recirculation on characteristics of hydrogen production in a two-stage hydrogen-methane fermentation process treating food wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p.5602-11, 2012.

- KUCZMAN, O., TAVARES, M.H.F., GOMES, S.G., GUEDES, L.P.G., GRISOTTI, G., Effects of stirring on cassava effluent treatment in an anaerobic horizontal tubular pilot reactor with support medium – A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.77, p.984-989, 2017.
- KUMAR, S., DHEERAN, P., SINGH, S.P., MISHRA, I.M., ADHIKARI, D.K., Kinetic studies of two-stage sulphury acid hydrolysis of sugarcane bagasse, **Renewable Energy**, v. 83, p.850 – 8, 2015.
- KUMAR G., MUDHOO A., SIVAGURUNATHAN, P., NAGARAJAN, D., GHIMRE, A., LAY, C.H., Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. **Bioresour Technol**, v. 219, p.725-737, 2016.
- KUNINOBU, M., KUNINOBU, M., OGAWA, H. I., KATO, Y., Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 16, p.407-416, 1999.
- KURADE, M.B., SAHA, S., SALAMA, E.-S., PATIL, S.M., GOVINDWAR, S.P., JEON, B.-H. Acetoclastic methanogenesis led by Methanosarcina in anaerobic co-digestion of fats, oil and grease for enhanced production of methane. **Bioresour Technol**, p.272, p.351, 2019
- KWAK, J.H. ISLAM, M.S., WANG, S., MESSELE, S.A., NAETH, M.A., EL-DIN, M.G., CHANG, S.X. Biochar properties and lead (II) adsorption capacity depend on feedstock type, pyrolysis temperature, and steam activation. **Chemosphere**, v. 231, p. 393-404, 2019.
- LACERDA, I.C., MIRANDA, R.L., BORELLI, B.M., NUNES, A.C.; NARDI, R.M.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C. A.; Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil, **Int. Journal Food Microbiology**, v.105, p. 213–219, 2005.
- LAY JJ, FAN KS, HWANG JI, CHANG JI, HSU PC. Factors affecting hydrogen production from food wastes by Clostridium-rich composts. **Journal of Environmental Engineering**; v.131, p.595–602, 2005.
- LEANG C., COPPI, M.V., LOVLEY, D.R. OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. **J Bacteriol**, v.185:2096–103, 2003.
- LEANG, C., QIAN, X., MESTER, T., LOVLEY, D.R. Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. **Appl Environ Microbiol**, v.76:4080–4, 2010.
- LEE KS, LIN PJ, CHANG JS. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **Int J Hydrogen Energy**, v. 31, p.465-72, 2006
- LEE, H.S., SALERNO, M.B., RITTMANN, B.E., Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. **Environment Science Technology**, v.42, p.2401–7, 2008.
- LEE, H.S., VERMAAS, W.F., RITTMANN, B.E. Biological hydrogen production: prospects and challenges. **Trends Biotechnology**; v.28, p.262–71, 2010.
- LEE, D. J.; SHOW, K. Y.; SU, A. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 18, p. 8393–8402, 2011.

LEI, Y., WEI, L., LIU, T., XIAO, Y., DANG, Y., SUN, D. Magnetite enhances anaerobic digestion and methanogenesis of fresh leachate from a municipal solid waste incineration plant. **Chem Eng J**, v.348, p.992–9, 2018.

LEITE W. R. M.; GOTTARDO, M.; PAVAN P.; FILHO P. B.; BOLZONELLA D. Performance and energy aspects of single and two phase thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 86, p. 1324–31, 2016.

LETTINGA, A. F. M.; VAN VELSEN, S. H.; ZEEUW, W. Feasibility of anaerobic digestion for the direct treatment of, and the energy recovery from urban wastes. **Studies in Environmental Sciences**, v.9, p. 97-108, 1981.

LI, C.L.; FANG, H.H.P; Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Crit Rev Env Sci Technol**, v.37, p.1–39, 2007.

LI, Y.C., LIU, Y.C., CHU, C.Y., CHANG, P.L., HSU, L.W., LIN, P.J., WU, S.I., Technoeconomic evaluation of biohydrogen production form wastewater and agricultural waste, **Int. J Hydrogen Energy**, v.37, p.15740-15710, 2012.

LI, H., DONG, X., DA SILVA, E.B., DE OLIVEIRA, L.M., CHEN, Y., MA, L.Q. Mechanisms of metal sorption by biochars: biochar characteristics and modifications. **Chemosphere**, v.178, 466-478, 2017.

LI, Q., XU, M., WANG, G., CHEN, R., QIAO, W., WANG, X., Biochar assisted thermophilic co-digestion of food waste and waste activated sludge under high feedstock to seed sludge ratio in batch experiment. **Bioresource Technology**, v.249, p.1009–1016, 2018.

LI, D., SONG, L., FANG, H., LI, P., TENG, Y., LI, Y., LIU, R., NIU, Q., Accelerated biomethane production rate in thermophilic digestion of cardboard with appropriate biochar: Dose-response kinetic assays, hybrid synergistic mechanism, and microbial networks analysis. **Bioresource Technology**, v. 290, p.121782, 2019.

LI, W., CHENG, C., CAO, G., REN, N. Enhanced biohydrogen production from sugarcane molasses by adding Ginkgo biloba leaves. **Bioresource Technology**, v.298, p.122523, 2020.

LIN, L., YANG, L., XU, F., MICHEL, F.C., LI, Y. Comparison of solid-state anaerobic digestion and composting of yard trimmings with effluent from liquid anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v.169, p.439–446, 2014.

LIN, L., YANG, L., LI, Y., Effect of feedstock components on thermophilic solid state anaerobic digestion of yard trimmings. **Energy Fuels**, v.29, p.3699–3706, 2015.

LIN, C.Y.; NGUYEN, T.M., CHU, C.Y., LEU, H.J., LAY, C.H., Fermentative biohydrogen production and its byproducts: A mini review of current technology developments, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.82, p. 4215–4220, 2018.

LIMA, D.M., MOREIRA, W.K., ZAIAT, M. Comparison of the use of sucrose and glucose as substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. **Int J Hydrogen Energy**, v.38; p. 15074- 15083, 2013.

LIMA DMF, INOUE RK, RODRIGUES JAD, RATUSZNEI SM, ZAIAT M. Biohydrogen from cheese whey treatment in an AnSBBR: achieving process stability. **Braz J Chemical Eng**; v.32, p.397-408, 2015.

LIMA, D.M.F., LAZARO, C.Z., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M. Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey. **Journal of Environmental Management**, v.169, p.191–201, 2016.

LINVILLE, J.L., SHEN, Y., IGNACIO-DE LEON, P.A., SCHOENE, R.P., URGUN-DEMIRTAS, M. In-situ biogas upgrading during anaerobic digestion of food waste amended with walnut shell biochar at bench scale. **Waste Management Res**, v.35, p.669–79, 2017.

LIU, C., WANG, W., ANWAR, N., MA, Z.H., LIU, G.Q., ZHANG, R. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of food waste under mesophilic and thermophilic conditions. **Energy Fuels**, v.31, p. 2976–2984, 2017.

LIU, J., ZHOU, W., FAN, S., QIU, B., WANG, Y., XIAO, Z., TANG, X., WANG, W., JIAN, S., QIN, Y., Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers, **Int J Hydrogen Energy**; v. 44, p.11617-11624, 2020.

LOPEZ-HIDALGO, A.M., ALVARADO-CUEVAS, Z.D., DE LEON-RODRIGUEZ, A. Biohydrogen production from mixtures of agro-industrial wastes: chemometric analysis, optimization and scaling up. **Energy**, v.159, p.32–41, 2018.

LOVATO, G., BEZERRA, R., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M., Effect of Feed Strategy on Methane Production and Performance of an AnSBBR Treating Effluent from Biodiesel Production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.166, p.2007–2029, 2012.

LOVATO, G.; MONCAYO BRAVO, I.S.; RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J. A.D.; ZAIAT, M.; The effect of organic load and feed strategy on biohydrogen production in an AnSBBR treating glycerin-based wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 154; p. 128-137, 2015.

LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; TRIVELONI, M.; RATUSZNEI, S.M.; RODRIGUES, J. A.D.; Methane Production by Co-Digesting Vinasse and Whey in AnSBBR: Effect of Mixture Ratio and Feed Strategy. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.187, p.28–46, 2019.

LOVLEY, D.R. Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer. **Annu. Rev. Microbiol.** 71, 643–664, 2017.

LULLIO, T. G., SOUZA, L. P., RATUSZNEI, S. M, RODRIGUES, J. A. D., ZAIAT, M., Biomethane Production in an AnSBBR Treating Wastewater from Biohydrogen Process, **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.174, p.1873–1896, 2014.

LU, F., LUO, C., SHAO, L., HE, P. Biochar alleviates combined stress of ammonium and acids by firstly enriching *Methanosaeta* and then *Methanosarcina*. **Water Resource**. v.90, p.34 – 43, 2016.

LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., ZHOU, Q., WANG, J.-Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: effects of temperature and pH. **Applied Energy**, v.87, p.3710–3717, 2010.

LUO, G., XIE, L., ZHOU, Q., ANGELIDAKI, I. Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. **Bioresource Technology**, v.102, p.8700–6, 2011.

LUO, C., LÜ, F., SHAO, L., HE, P. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes. **Water Resource**. V.68, p.710–718, 2015.

LUCAS, S.D.M., PEIXOTO, G., MOCKAITIS, G., ZAIAT, M., GOMES, S.D. Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: kinetic evaluation and technological feasibility. **Renew Energy**, v.75, p.496-504, 2015.

ŁUKAJTIS, R., HOŁOWACZ, I., KUCHARSKA, K., GLINKA, M., RYBARCZYK, P., PRZYJAZNY, A., KAMIŃSKI, M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.91, p.665–694, 2018.

LUTPI, N.A., JAHIM, M.D., MUMTAZ, T., HARUN, S., ABDUL, P.M. Batch and continuous thermophilic hydrogen fermentation of sucrose using anaerobic sludge from palm oil mill effluent via immobilization technique. **Process Biochemistry**, v.51, p. 297–307, 2016.

LUZ, F. C., CORDINER, S., MANNI, A., MULONE, V., ROCCO, V. Biochar characteristics and early applications in anaerobic digestion-a review. **J. Environmental Chemical Engineering**, v 6, 2892–2909, 2018.

MA, J., PAN, J., QIU, L., WANG, Q., ZHANG, Z. Biochar triggering multipath methanogenesis and subdued propionic acid accumulation during semi-continuous anaerobic digestion. **Bioresour. Technol.** 293, 122026, 2019.

MACLELLAN, J., CHEN, R., KRAEMER, R., ZHONG, Y., LIU, Y., LIAO, W. Anaerobic treatment of lignocellulosic material to co-produce methane and digested fiber for ethanol biorefining. **Bioresource Technology**, v. 130, p.418–423, 2013.

MAJHI, B.K., JASH, T., Two-phase anaerobic digestion of vegetable market waste fraction of municipal solid waste and development of improved technology for phase separation in two-phase reactor. **Waste Management**, v. 58, p. 152–159, 2016.

MANSSOURI, M.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Effects of Organic Loading, Influent Concentration, and Feed Time on Biohydrogen Production in a Mechanically Stirred AnSBBR Treating Sucrose-Based Wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 1832-1854, 2013.

MARI, A.G., **Produção de metano em reator AnSBBR a partir de efluente de fecularia de mandioca previamente acidificado: desempenho e viabilidade econômica**. Tese de doutorado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2018.

MARI, A.G., ANDREANI, C.L., TONELLO, T. U., LEITE, L.C.C., FERNANDES, J., LOPES, D.D., RODRIGUES, J.A.D., GOMES, S.D., Biohydrogen and methane production from cassava wastewater in a two-stage anaerobic sequencing batch biofilm reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, p. 5165-5174, 2020.

MARTÍN-GONZÁLEZ, L.; FONT, X.; VICENT, T. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p.1 - 5, 2013.

MASEBINU, S.O., AKINLABI, E.T., MUZENDA, E., ABOYADE, E. A review of biochar properties and their roles in mitigating challenges with anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 103, p.291–307, 2019.

MASPOLIM, Y., ZHOU, Y., GUO, C., XIAO, K., NG, W., Comparison of single-stage and two-phase anaerobic sludge digestion systems – Performance and microbial community dynamics. **Chemosphere**, v.140, p.54–62, 2015.

MCBEATH, A.V., SMERNIK, R.J., SCHNEIDER, M.P.W., SCHMIDT, M.W.I., PLANT, E.L. Determination of the aromaticity and the degree of aromatic condensation of a thermosequence of wood charcoal using NMR. **Org. Geochem.** 42, 1194–1202, 2011.

McCARTY, P. L.; SMITH, D. P. Anaerobic wastewater treatment. **Environmental Science Technology**, v. 20, 1.200 – 1.206, 1986.

MEIER, T.R.W, CREMONEZ, P.A., MANIGLIA, T.C., SAMPAIO, S.C., TELEKEN, J.G., SILVA, E.A., 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.250, p.120833, 2020.

MENENDEZ, J.A., ILLAN-GOMEZ, M.J., LEON, C.A., LEON, Y., RADOVIC, L.R. On the difference between the isoelectric point and point of zero charge, **Carbon** 33, V11, p. 1655–1659, 1995.

MENDIETA, O., CASTRO, L., RODRIGUEZ, J., ESCALANTE, H., Synergistic effect of sugarcane scum as an accelerant co-substrate on anaerobic co-digestion with agricultural crop residues from non-centrifugal cane sugar agribusiness sector. **Bioresource Technology**, v.303, p.122957, 2020.

MEUER, J., KUETTER, H.C., ZHANG, J.K., HEDDERICH, R., METCALF, W.W. Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. **The Proceedings of the National Academic of Science**, v. 99, p.5632-5637, 2002.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME, **Balço Energético Nacional 2019**. Secretaria de Energia, Download a partir da página do Ministério de Minas e Energia: <http://www.mme.gov.br>. Ano base 2018 / Empresa de Pesquisa Energética. - Rio de Janeiro: EPE, 2019.

MIZUBUTI, I.Y., PINTO, A.P., RAMOS, B.M.O., PEREIRA, E.S. **Métodos laboratoriais de avaliação de alimentos para animais**, Editora EDUEL, p. 229, 2009.

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

MONTOYA, A.C.V., MAZARELI, R.C.L., SILVA, E.L., VARESCHE, M.B.A. Improving the hydrogen production from coffee waste through hydrothermal pretreatment, co-digestion and microbial consortium bioaugmentation. **Biomass and Bioenergy**, v.137, p.10555, 2020.

MONTOYA-ROSALES, J.J., OLMOS-HERNANDEZ, D.K., PALOMO-BRIONES, R., MONTIEL-CORONA, V. MARI, A.G., RAZO-FLORES, E., Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. **Bioresource Technology**, v. 283, p. 251–260, 2019.

MORENO-ANDRADE, I., CARRILLO-REYES, J., SANTIAGO, S.G., BUJANOS-ADAME, M.C. Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: effect of HRT and microbial community analysis. **Int J Hydrogen Energy**, v.40, p.17246–52, 2015.

MORITA, M., MALVANKAR, N.S., FRANKS, A.E., SUMMERS, Z.M., GILOTEAUX, L., ROTARU, A.E., ROTARU, C., LOVLEY, D.R. Potential for direct interspecies electron transfer in methanogenic wastewater digester aggregates. **Mbio**, v.2, p. 0159–211, 2011.

MUSSOLINE, W.; ESPOSITO, G., LENS, P., SPAGNI, A., GIORDANO, A. Enhanced methane production from rice straw co-digested with anaerobic sludge from pulp and paper mill treatment process. **Bioresource Technology**, v.148, p.135–143, 2013.

MUÑOZ- PÁEZ, K.M., ALVARADO-MICHI, E.L., BUITRÓN, G., VALDEZ-VAZQUEZ, I. Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. **Int J Hydrogen Energy**, v.4, p.2289–97, 2019.

MÜLLER, N., WORM, P., SCHINK, B., STAMS, A.J., PLUGGE, C.M. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4; p. 489–499, 2010.

NAGARAJAN, D., LEE, D.J., CHANG, J.S., Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production. **Int J of Hydrogen Energy**, v.28, p.14362-14379, 2019.

NANDY, T., SHASTRY, S., KAUL, S.N. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. **J. Environ. Manag.**, v.65, p. 25-38, 2002.

NAKAMURA, F., GERMANO, M., TSAI, S., Capacity of aromatic compound degradation by bacteria from Amazon dark earth, **Diversity**, v.6, p.339–353, 2014.

NASR, N., ELBESHBISHY, E., HAFEZ, H., NAKHLA, G., NAGGAR, M.H.E. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage. **Bioresource Technology**, v.111, p.122–126, 2012.

- NEGI, S., DHAR, H., HUSSAIN, A., KUMAR, S. Biomethanation potential for co-digestion of municipal solid waste and rice straw: A batch study. **Bioresource technology**, v.154, p.139-144, 2018.
- NEGRI, C., RICCI, M., ZILIO, M., D'IMPORZANO, G., QIAO, W., DONG, R., ADANI, F., 2020. Anaerobic digestion of food waste for bio-energy production in China and Southeast Asia: a review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v.133, p.110138, 2020.
- NEUTELINGS, G. Lignin variability in plant cell walls: contribution of new models, **Plant Science**, v.181, p.379–386, 2011.
- NOVAES, L.F., SARATT, B.L., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., DE MORAES, D., RIBEIRO, R., ZAIAT, M., FORESTI, E. Effect of impeller type and agitation on the performance of pilot scale ASBR and AnSBBR applied to sanitary wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p.1647–1656, 2010.
- NOIKE, T., TAKABATAKE, H., MIZUNO, O., OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **Int J Hydrogen Energy**, v.27, p.1367-71, 2002.
- NUALSRI, C., KONGJAN, P., REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**; v. 41, p. 17884-17895, 2016.
- NUWAMANYA, E., CHIWONA-KARLTUN, L., KAWUKI, R.S., BAGUMA, Y. Bio-ethanol production from non-food parts of CASSAVA (*Manihot esculenta Crantz*). **Ambio**, v.41, p.262–270, 2012.
- OH, Y.K., KIM, S.H., KIM, M.S., PARK, S. Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. **Biotechnology Bioengineering**, v.88, p.690–8, 2004.
- O-THONG, S., PRASERTSAN, P., INTRASUNGKHA, N., DHAMWICHUKORN, S., BIRKELAND, N.K. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. **Enzyme Microb Technol**, v.41, p. 583–590, 2011.
- O-THONG, S., MAMIMIN, C., PRASERTSAN, P., Biohythane **Production from Organic Wastes by Two- Stage Anaerobic Fermentation Technology**, capítulo 5, Advances in Biofuels and Bioenergy. Ed. InterchOpen, p. 84 -85, 2018.
- OLIVEIRA, D. S.; PRINHOLATO, A. C.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. R.; ZAIT, M.; FORESTI, E. AnSBBR applied to the treatment of wastewater from a personal care industry: Effect of organic load and fill time. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 3.070–3.081, 2009.
- OLIVEIRA, R.P., RATUSZNEI, S.M., RODRIGUES, J.A.D., ZAIAT, M., FORESTI, E. Interaction effects of organic load and cycle time in an ASBR applied to a personal care industry wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v.91, p.2499–2505, 2010.

PACHAPUR, V.L., SARMA, S.J., BRAR, S.K., LE BIHAN, Y., BUELNA, G., VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v.193, p.297–306, 2015.

PALMA, D., FUESS, L.T., LIMA-MODEL, A. E., CONCEIÇÃO, K.N., CEREDA, M.N., TAVARES, M.H.F., GOMES, S.D., Using dolomitic limestone to replace conventional alkalization in the biodigestion of rapid acidification cassava processing wastewater, **Journal of Cleaner Production**, v.172, p. 2942-2953, 2018.

PANDEY, D., DAVEREY, A., ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**. V.255, p. 120267, 2020.

PANJICKO, M., ZUPANCIC, G.D., FANEDL, L., LOGAR, R.M., TISMA, M., ZELIĆ, M. Biogas production from brewery spent grain as a mono-substrate in a two-stage process composed of solid-state anaerobic digestion and granular biomass reactors. **Journal of Cleaner Production**, v166, p.519–529, 2017.

PAPA, G., RODRIGUEZ, S., GEORGE, A., SCHIEVANO, A., ORZI, V., SALE, K.L., SINGH, S., ADANI, F., SIMMONS, B.A., Comparison of different pretreatments for the production of bioethanol and biomethane from corn stover and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 101-110, 2015.

PAREEK, A., DOM, R., GUPTA, J., CHANDRAN, J., ADEPU, V., BORSE, P., Insights into renewable hydrogen energy: Recent advances and prospects, **Materials Science for Energy Technologies**, v.3, p. 319-327, 2020.

PARK, M.J., JO, H.J., PARK, D., LEE, D.S., PARK, J.M. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 6194–202, 2010.

PARK, J.; SIN, Y.; KIM, J.S.; KIM, S.H., Effects of alginate immobilization on dynamic membrane formation and H<sub>2</sub> fermentation from galactose, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 05, 2019.

PATTIYA, A., SUKKASI, S., GOODWIN, V. Fast pyrolysis of sugarcane and cassava residues in a free-fall reactor. **Energy**, v.44, p.1067–1077, 2012.

PATCHAREE, I., RANGSANVIGIT, P., MALAKUL, P., CHAVADEJ, S. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. **Bioresource Technology**, v.173, p.256–265, 2014.

PAULY, M. KEEGSTRA, K., Cell-Wall Carbohydrates and Their Modification as a Resource for Biofuels. **Plant Journal**, v.54, p.559-568, 2008.

PAUDEL, S.; KANG, Y.S.; YOO, Y.; SEO, G.T. 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.

PAWAR, S.S., VAN NIEL, E.W. Thermophilic biohydrogen production: how far are we? **Appl Microbiol Biotechnol**, v.97, p.7999–8009, 2013.

PENTEADO, E. D. LAZARO, C.Z., SAKAMOTO, I.K., ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen Production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, n. 14, p. 6137-6145, 2013.

PETROVIC, A.; VOHL, S.; CENCIC PREDIKAKA, T.; BEDOIĆ, R.; SIMONIC, M.; BAN, I.; UCEK, L. Pyrolysis of Solid Digestate from Sewage Sludge and Lignocellulosic Biomass: Kinetic and Thermodynamic Analysis, Characterization of Biochar. **Sustainability**, v.13, p. 9642, 2021.

PLANGKLANG, PENSRI; REUNGSANG, ALISSARA; PATTRA, SAKCHAI. Enhanced bio-hydrogen production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. **International journal of Hydrogen Energy**, v.37. p. 15525 e 15532, 2012.

PRABAKAR, D., MANIMUDI, V.T, SUVETHA, S.K., SAMPATH, S., MAHAPATRA, D.M., RAJENDRAN, K., PUGAZHENDHI, A. Advanced biohydrogen production using pretreated industrial waste: Outlook and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 96, p.306–324, 2018.

POHLAND, F.G., AND GHOSH, S. Developments in Anaerobic Stabilization of Organic Wastes—The Two-Phase Concept. **Environmental Letters**, v.1, p.255-266, 1971.

POLADYAN A, TRCHOUNIAN K, VASSILIAN A, TRCHOUNIAN A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. **Renewable Energy**, v.115, p.931–6, 2018.

QAMBRANI, N.A., RAHMAN, M.M., WON, S., SHIM, S., RA, C. Biochar properties and ecofriendly applications for climate change mitigation, waste management, and wastewater treatment: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.79, p.255–73, 2017.

QI, Q., SUN, C., CRISTHIAN, C., ZHANG, T., ZHANG, J., TIAN, H., HE, Y., TONG, W.Y. Enhancement of methanogenic performance by gasification biochar on anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v.330, p.124993, 2021.

QINGHUA, Z., JIANG, H., MIN, T., ZHONGGUI, M., LEI, T., JIANHUA, Z., HONGJIAN, Z., Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. **Bioresource Technology**. 102, 8899–8906, 2011.

RABELO, C.A.B.S., SOARES, L.A., SAKAMOTO, I.K., SILVA, E.L., VARESCHE M.B.A. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. **Journal of Environmental Management**, v.223, p.952–63, 2018.

RAJENDRAN, K., MAHAPATRA, D., VENKATRAMAN, A.V., MUTHUSWAMY, S., PUGAZHENDHI, A. Advancing anaerobic digestion through two-stage processes: current developments and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.123, p.109746, 2020.

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, 5239-5251, 2020.

RAMPRAKASH, B.; MUTHUKUMAR, K.; Comparative study on the performance of various pretreatment and hydrolysis methods for the production of biohydrogen using *Enterobacter aerogenes* RM 08 from rice mill wastewater, **International Journal of Hydrogen Energy**, v.40, p. 9106-9112, 2015.

RASAPOOR, M., YOUNG, B., SARMAH, A., ZHUANG, W.-Q., BAROUTIAN, S. Recognizing the challenges of anaerobic digestion: critical steps toward improving biogas generation. **Fuel**, v.261, p.116497, 2020.

RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; CAMARGO, E. F. M.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 127-132, 2000.

REGALBUTO, J.R., ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**. University of Illinois, Chicago, 2004.

REJAB, A.R., SALIM, M.R., SOHAILI, J., ANUAR, A.N., LAKKABOYANNA, S.K. Performance of integrated anaerobic/aerobic sequencing batch reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p.967–974, 2017.

REN, N.Q., WANG, B.Z., HUANG, J.C. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. **Biotechnol Bioeng**, v.54, p.428- 33, 1997.

REN N, GUO W, LIU B, CAO G, DING J. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. **Current Opinion Biotechnology**, v.22, p.365–70, 2011.

REN, N.Q., ZHAO, L., CHEN, C., GUO, W.Q., CAO, G.L. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H<sub>2</sub>: key challenges and new insights. **Bioresource Technology**, v.215, p.92–9, 2016.

RIPLEY, L.E., BOYLE, W.C., CONVERSE, J.C., Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution**. V.58, p.406-411, 1986.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**, ed.McGraw-Hill Education Private, p. 753, 2001.

RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M.; Fed-batch and batch operating mode analysis of a stirred anaerobic sequencing reactor with self-immobilized biomass treating low-strength wastewater. **Journal of Environmental Management**, v.69, p.193-200, 2003.

RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., ZAIAT, M., FORESTI, E. **New configurations and operation strategies of anaerobic biofilm bioreactors applied to wastewater treatment**. In: Hearn, E.C. Ed., Focus on Biotechnology Research. Nova Science Publishers, New York, 2006.

ROSA, P.R.F.; GOMES, B.C.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L.; 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.

ROTARU, A.E., SHRESTHA, P.M., LIU, F., SHRESTHA, M., SHRESTHA, D., EMBREE, M., ZENGLER, K., WARDMAN, C., NEVIN, K.P., LOVLEY, D.R. A new model for electron flow during anaerobic digestion: Direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. **Energy Environ. Sci.**, 2014.

ROY S, VISHNUVARDHAN M, DAS D; Continuous hydrogen production in packed bed reactor. **Applied Energy** 136:51–58, 2014.

ROY, S.; DAS, D.; Biohythane production from organic wastes: present state of art, **Environmental Science and Pollution. Research**, v. 23; p. 9391-9410, 2016.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

SAIF, I., SALAMA, E.S., USMAN, M., LEE, D.S., MALIK, K., LIU, P., LI, X. Improved digestibility and biogas production from lignocellulosic biomass: Biochar addition and microbial response. **Industrial Crops & Products**, v. 171, p.113851, 2021.

SAJJADI, B., CHEN, W.Y., RAMAN, A.A.A., IBRAHIM, S., Microalgae lipid and biomass for biofuel production: a comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renew. Sustain Energy Rev.**, 2018.

SAKARIKA, M., STAVROPOULOS, K., KOPSAHELIS, A., KOUTRA, E., ZAFIRI, C., KORNAROS, M. Two-stage anaerobic digestion harnesses more energy from the co-digestion of end-of-life dairy products with agro-industrial waste compared to the single-stage process. **Biochemical Engineering Journal**, v.153, p.107404, 2020.

SALERNO MB, PARK W, ZUO Y, LOGAN BE. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. **Water Research**, v.40, p. 1167–72, 2006.

SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; TRAVIESO, L.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M.F. Effect of organic loading rate on the stability, operational parameters and performance of a secondary up flow anaerobic sludge bed reactor treating piggery waste. **Bioresource Technology**, v.96, p.335-344, 2005.

SÁNCHEZ, A. S.; SILVA, Y. L.; KALID, R. A.; COHIM, E.; TORRES, E. A., Waste bio-refineries for the cassava starch industry: New trends and review of alternatives, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.73, p.1265–1275, 2017.

SANTANA JUNIOR., A.E.S., DUDA, R.M., OLIVEIRA, R.A. Improving the energy balance of ethanol industry with methane production from vinasse and molasses in two-stage anaerobic reactors. **Journal of Cleaner Production**. V.238, p. 117577, 2019.

SANTOS, J.D., VEIT, M.T., PALACIO, S.M., DA CUNHA GONCALVES, G., FAGUNDES-KLEN, M.R. Evaluation of the Combined Process of Coagulation/Flocculation and Microfiltration of Cassava Starch Wastewater: Removal Efficiency and Membrane Fouling. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 228, 238, 2017.

SARKAR O., VENKATA MOHAN S. Deciphering acidogenic process towards biohydrogen, biohythane and short chain fatty acids production: multi-output optimization strategy. **Biofuel Research Journal**, v.11, p.458-469, 2016.

SASAKI, K., SASAKI, D., MORITA, M., HIRANO, S., MATSUMOTO, N., OHMURA, N., IGARASHI, Y. Bioelectrochemical system stabilizes methane fermentation from garbage slurry. **Bioresource Technology**, v.101, p.3415–3422, 2010.

SAWATDEENARUNAT, C.; SURENDRA, K.C.; TAKARA, DEVIN; OECHSNER, HANS; KHANAL, SAMIR K. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities, **Bioresource Technology**, v.178, p.178–186, 2015.

SHANMUGAM, S.R., ADHIKARI, S., NAM, H., KARSAJIB, S. Effect of bio-char on methane generation from glucose and aqueous phase of algae liquefaction using mixed anaerobic cultures. **Biomass Bioenergy**, 2017.

SCHIEVANO, A., TENCA, A., LONATI, S., MANZINI, E., ADANI, F. Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? **Applied Energy**, v. 124, p.335–342, 2014.

SCHWANNINGER, M., RODRIGUES, J.C., PEREIRA, H., HINTERSTOISSER, B. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. **Vibrational Spectroscopy**, v.36, p.23-40, 2004.

SEAB – SECRETARIA DE AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ. Departamento de Economia Rural – DEAL. **Evolução da área colhida, produção, rendimento, participação e colocação Paraná/Brasil**. Download a partir da página <http://www.agricultura.pr.gov.br>, Acesso em 12/10/2021.

SHAH, F.A., MAHMOOD, Q., RASHID, N., PERVEZ, A., RAJA, I.A., SHAH, M.M., Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 627-642, 2015.

SHAHBAZ, M., BALSALOBRE-LORENTE, D.,SINHAD, A., Foreign direct Investment–CO2 emissions nexus in Middle East and North African countries: Importance of biomass energy consumpti, **Journal of Cleaner Production**, v.217, p.603- 614, 2019.

- SHEN, Y., FORRESTER, S., KOVAL, J., URGUN-DERMITAS, 2017. Yearlong semi-continuous operation of thermophilic two-stage anaerobic digesters amended with biochar for enhanced biomethane production, **Journal of Cleaner Production**, v. 167, p. 863-874, 2017.
- SHEN, R., JING, Y., FENG, J., LUO, J., YU, J., ZHAO, L. Performance of enhanced anaerobic digestion with different pyrolysis biochars and microbial communities. **Bioresour Technol.** 296, 122354, 2020.
- SHENG, C., AZEVEDO, J., Estimating the higher heating value of biomass fuels from basic analysis data, **Biomass Bioenergy**, v. 28, p. 499–507, 2005.
- SHENG, G.P., YU, H.Q., LI, X.Y., Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review, **Biotechnology Advances**, v. 28, p.882–894, 2010.
- SHI, Y., HU, H., REN, H., Dissolved organic matter (DOM) removal from biotreated coking wastewater by chitosan-modified biochar: Adsorption fractions and Mechanisms. **Bioresour Technol.**, v. 297, p. 122281, 2020.
- SHIMABUKU, K. K., PAIGE, J. M., AGUERO, M. L., SUMMERS, R. S., Simplified Modeling of Organic Contaminant Adsorption by Activated Carbon and Biochar in the Presence of Dissolved Organic Matter and Other Competing Adsorbates. **Environ. Sci. Technol.** v. 51, p.10031–10040, 2017.
- SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; TAY, J.H.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S.; Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, p.15616- 15631, 2012.
- SILVA, A.F.R., MAGALHÃES, N.C., CUNHA, P.V.M., AMARAL, M.C.S., KOCH, K.. 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. p. 110034, 2020.
- SILVA, T.C.D, ISHA, A., CHANDRA, R., VIJAY, V.K., SUBBARAO, P. M.M, KUMAR, R., PRAKASH, V., CHAUDHARY, V.P., SINGH, H., KHAN, A.A., KUMAR, T., KOVACS, K. Enhancing methane production in anaerobic digestion through hydrogen assisted pathways – A state-of-the-art review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 151, 111536, 2021.
- SINHA, P., PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p.7460-7478, 2011.
- SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; SEN, B.; LIN, C.Y.; Development of a Novel Hybrid Immobilization Material (HY-IM) for Fermentative Biohydrogen Production from Beverage Wastewater, **Journal of the Chinese chemical society**, v.61, p. 827-830, 2014.
- SIVAMANI, S., SHANMUGAM, A., BASKAR, R., Optimization of ethanol production from mixed feedstock of cassava peel and cassava waste by coculture of *Saccharomyces fibuligera* NCIM 3161 and *Zymomonas mobilis* MTCC 92, **Chemical Bioprocess Engineering**. V.42, 2015.

SIVAMANI, S., CHANDRASEKARAM, A.P.; BALAJI, M.; SHAMUGAPRAKASH, M.; HOSSEINI-BANDEGHAREI, A.; BASKAR, R. Evaluation of the potential of cassava-based residues for biofuels production, **Rev Environmental Biothecnology**, v. 17, p. 553-570, 2018.

SUMMERS, Z.M., FOGARTY, H.E., LEANG, C., FRANKS, A.E., MALVANKAR, N.S., LOVLEY, D.R. Direct exchange of electrons within aggregates of an evolved syntrophic coculture of anaerobic bacteria. **Science**, v.330:1413–5, 2010.

SOARES, J.F., CONFORTIN, T.C., TODERO, I., MAYER, F.D., MAZUTTI, M.A., Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2020; v.117. p.09484.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ S.; Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 4191 -4110, 2010.

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

STAMATELATOU, K., PIND, P.F., ANGELIDAKI, I., AHRING, B.K., LYBERATOS, G. Monitoring and control of anaerobic reactors. **Advanced Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 82, p.135-82, 2003.

STEVANATO, A.; MURATI, E. M. N.; HASHIMOTO, E. M.; SILVA, C. DA.; VIERA, D. DO C.; BERZOTTI, J. Produção de carvão ativado a partir da casca de sementes de pinhão da Araucária *angustifolia*. In: AMÉRICO, J. N. DA S.; VIEIRA, A. R. L. **Ciências Tecnológicas, exatas e da terra e seu alto grau de aplicabilidade**. Ponta Grossa: Atena, 2020. p. 123-140.

STRAUSS, S.L., KLUEPFEL, D.A. Anaerobic soil disinfection: a chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **J. Integr. Agric**, 2015.

SU, H., CHENG, J., ZHOU, J., SONG, W., CEN, K. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.1780-1786, 2009.

SU, C., ZHAO, L., LIAO, L., QIN, J., LU, Y., DENG, Q., CHEN, M., HUANG, Z. Application of biochar in a CIC reactor to relieve ammonia nitrogen stress and promote microbial community during food waste treatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 209, p.353–362, 2019.

SUGIARTO, Y., MAYANG, N. S., SUNYOTO, M.Z., JONES, I., ZHANG, D. Effect of biochar addition on microbial community and methane production during anaerobic digestion of food wastes: The role of minerals in biochar. **Bioresource Technology**, v. 323 p. 124585, 2021.

SUN, T., LEVIN, B.D., GUZMAN, J.J., ENDERS, A., MULLER, D.A., ANGENENT, L.T., LEHMANN, J. Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon. **Nat. Commun.** 8, 1–12, 2017.

SUN, C., LIU, F., SONG, Z., WANG, J., LI, Y., PAN, Y., SHENG, T., LI, L. Feasibility of dry anaerobic digestion of beer lees for methane production and biochar enhanced performance at mesophilic and thermophilic temperature. **Bioresource Technology**, v.276, 65–73, 2019.

SUNYOTO NMS, ZHU M, ZHANG Z, ZHANG D. Effect of biochar addition on hydrogen and methane production in two-phase anaerobic digestion of aqueous carbohydrates food waste. **Bioresource Technology**, v.2.19, p.29–36, 2016.

TAN, I.A., AHMAD, A., HAMEED, B.H. Adsorption of basic dye on high-surfacearea activated carbon prepared from coconut husk: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **J. Hazard Mater.**, v.154, p. 337–346, 2008.

TAN, G., SUN, W., XU, Y., WANG, H., XU, N., Sorption of mercury (II) and atrazine by biochar, modified biochars and biochar based activated carbon in aqueous solution. **Bioresource Technology**, 211, p. 727 – 735, 2016.

TAN, X., LIU, S., LIU, Y., GU, Y., ZENG, G., HU, X., WANG, X., LIU, S., JIANG, S., Biochar as potential sustainable precursors for activated carbon production: Multiple applications in environmental protection and energy storage. **Bioresource Technology**, 227, p. 359 – 372, 2017.

TEJADO, A., PENA, C., LABIDI, J., ECHEVERRIA, J.M., MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v.98, p.1655-63, 2007.

TENGERDY, R.P., SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.169-79, 2003.

THONGCHUL, N., NAVANKASATTUSAS, S., Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis, **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.33, p. 407-416, 2010.

TONELLO, T.U.; ANDREANI, C.L.; MARI, A.G.; FERNANDES, J.R.; GOMES, S.D.; Biohydrogen production in AnSBBR in fed-batch from starch effluent: influence of organic load. **Engenharia Agrícola**, v.38, p.768-775, 2018.

TORRES, D.G.B., LUCAS, S.D.M., ANDREANI, C.L., CARVALHO, K.Q., COELHO, S.R.M., GOMES, S.D. Hydrogen production and performance of anaerobic fixed-bed reactors using three support arrangements from cassava starch wastewater. **Engenharia Agrícola**, v.37, p.160-72, 2017.

TRAVAINI, R., MARTÍN-JUAREZ, J., LORENZO-HERNANDO, A., BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, v.199, p.2–12, 2016.

TZVETKOV, G. MIHAYLOVA, S., STOITCHKOVA, K., TZVETKOV, P., SPASSOV, T. Mechanochemical and chemical activation of lignocellulosic material to prepare powdered activated carbons for adsorption applications, **Powder Technol.**, v.299, p. 41–50, 2016.

UNGKULPASVICH, U., BARAMEE, S., UKE, A., KOSUGI, A. Symbiotic chitin degradation by a novel anaerobic thermophilic bacterium *Hydrogenispora* sp. UUS1-1 and the bacterium *Tepidanaerobacter* sp. GT38. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 144, p.109740, 2021.

UZI, A., SHEN, Y., KAWI, S., LEVY, A., WANG, C.H., Permittivity and chemical characterization of woody biomass during pyrolysis and gasification. *Chem. Eng. J.* 355, 255–268, 2019.

VAN GINKEL, S., LOGAN, B.E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental Science Technology**, v.;3, p. 9351 -6, 2005.

VASQUEZ, I. V., VARALDO, H.M.P, Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p.1000 -13, 2009.

VENKITESHWARAN, K., BOCHER, B., MAKI, J., ZITOMER, D. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. **Microbiol. Insights**, v. 8, p.37–43, 2015.

VENTURI, L., MELO, A.V.F., FREGONEZE, A.C., Comparative Analysis of the Development of Energy Mixes in the United Kingdom and Brazil, **The Journal of World Energy Law & Business**, v.14, p. 1–16, Issue 1, 2021.

VEEKEN, A., KALYUZHNYI, S., SC HARFF, H., HAMELERS, B. Effect of pH and VFA on hydrolyses of organic solid waste. **Journal of Environmental Engineering**, v. 126, n.12, p. 1076-1081, 2000.

VIGGI, C.C., ROSSETTI, S., FAZI, S., PAIANO, P., MAJONE, M., AULENTA, F. Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation. **Environ Science Technology**, v.48, p.7536-43, 2014.

VOLPINI, V., LOVATO, G., ALBANEZ, R., RATUSZNEI, S.M., RODRIGUES, J.A.D. Biomethane generation in an AnSBBR treating effluent from the biohydrogen production from vinasse: optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimation. **Renewable Energy**, v. 116, p.288–298, 2018.

WADJEAM, P., REUNGSANG, A., IMAI, T.; PLANGKLANG, P., Co-digestion of cassava starch wastewater with buffalo dung for bio-hydrogen production, **International Journal of Hydrogen Energy**, v.44, p.14694- 06, 2019.

WANG, J.L., WAN, W. Effect of Fe<sup>2+</sup> concentrations on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, V. 33, p. 1215–20, 2008.

WANG, B., WAN, W., WANG, J. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **Bioresource Technology**, v.100, p.1211–3, 2009.

WANG, B., WAN, W., WANG, J. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p.7013- 9, 2008.

WANG, X., ZHAO, Y.C. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p. 245–254, 2009.

WANG, C., WANG, D.D.H., MULLER, K., QIN, Y., WANG, H., Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p.22, 2016.

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

WANG, G., LI, Q., GAO, X., WANG, X.C. Synergetic promotion of syntrophic methane production from anaerobic digestion of complex organic wastes by biochar: performance and associated mechanisms. **Bioresour Technology**, v. 250:812–20, 2018b.

WANG, G., LI, Q., YUWEN, C., GONG, K., SHENG, L., LI, Y., XING, Y., CHEN, R., Biochar triggers methanogenesis recovery of severely acidified anaerobic digestion system via hydrogen-based syntrophic pathway inhibition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, p. 9666-9677, 2020.

WANG, C., LIU, C., WANG, C., XING, B., ZHU, S., HUANG, J., XU, X., ZHU, L. Biochar facilitates rapid restoration of methanogenesis by enhancing direct interspecies electron transfer after high organic loading shock, **Bioresource Technology**, v.320, p.124360, 2021a.

WANG, S., MENG, Q., ZHU, Q., NIU, Q., YAN, H., LI, K., LI, G., LI, X., LIU, H., LIU, H., LI, Q., Efficient decomposition of lignocellulose and improved composting performances driven by thermally activated persulfate based on metagenomics analysis, **Science of the Total Environment**, 794, 148530, 2021b.

WATTHIER, E., ANDREANI, C.L., TORRES, D.G.B., KUCZMAN, O., TAVARES, M.H.F., LOPES, D.D., GOMES, S.D., Cassava wastewater treatment in fixed-bed reactors: Organic matter removal and biogas production. **Frontier in sustainable food systems**, v. 2, p. 1-8, 2019.

WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**. V.85, p.849–860, 2010.

WEBER, K.A., ACHENBACH, L.A., COATES, J.D. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. **Nat Rev Microbiol**, v.;4:752–64, 2006.

WILLIAMS, J., WILLIAMS, H., DINSDALE, R., GUWY, A., ESTEVES, S. Monitoring methanogenic population dynamics in a full-scale anaerobic digester to facilitate operational management. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 234–242, 2013.

WIJITKOSUM, S., SRIBURI, T. Applying Cassava Stems Biochar Produced from Agronomical Waste to Enhance the Yield and Productivity of Maize in Unfertilized Soil. **Fermentation**, v. 7, p. 277, 2021.

WOICIECHOWSKI, A.L., NITSCHKE, S., PANDEY, A., SOCCOL, C.R., Acid and Enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study, **Brazilian archives of biology and technology**, v.45, p. 393-400, 2002.

WONGTHANATE, J., CHINNACOTPONG, K., KHUMPPONG, M. Impacts of pH, temperature and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. **International Journal of Energy Environmental Engineering**, v.5, p.1–6, 2014.

WU KJ, CHANG CF, CHANG JS. Simultaneous production of hydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. **Process Biochemical**, v.42, p.1165-71, 2007.

WU, B., WANG, X., DENG, Y.Y., HE, X.L., LI, Z.W., LI, Q. Adaptation of microbial community during the start-up stage of a thermophilic anaerobic digester treating food waste. **Microbiology and Fermentation Technology**, v. 80. p. 2025, 2016.

XIA A, JACOB A, HERRMANN C, TABASSUM MR, MURPHY JD. Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids from the seaweed carbohydrate mannitol. **Biotechnology Bioenergy**, v.193, p.488-97, 2015.

XIE, S., HAI, F.L., ZHAN, X., GUO, W., NGO, H.H., PRICE, W.E., NGHIEM, L.D., Anaerobic co-digestion: A critical review of mathematical modelling for performance optimization. **Bioresource Technology**, v.222, p.498-512, 2016.

XIE, Z., MENG, X., DING, H., CAO, Q., CHEN, Y., LIU, X., LI, D., The synergistic effect of rumen cellulolytic bacteria and activated carbon on thermophilic digestion of cornstalk. **Bioresource Technology**, v. 338, p.125566, 2021.

XIONG, J., HASSAN, M., WANG, M., DING, M., Methane enhancement by the co-digestion of soybean straw and farm wastewater under different thermo-chemical pretreatments. **Renewable Energy**, v. 145, p.116-123, 2020.

XU, H., WANG, C., YAN, K., JING, W., ZUO, J., WANG, K. Anaerobic granule-based biofilms formation reduces propionate accumulation under high H<sub>2</sub> partial pressure using conductive carbon felt particles. **Bioresource Technology**, v. 216, p.677–683, 2016.

XU, F., LI, Y., GE, X., YANG, L., LI, Y. Anaerobic digestion of food waste – challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v.247, p.1047–58, 2018.

XU, S., ZHU, J., MENG, Z., LI, W., REN, S., WANG, T. Hydrogen and methane production by co-digesting liquid swine manure and brewery wastewater in a two-phase system. **Bioresource Technology**. v.293, p.122041, 2019.

XUE, Y., LIU, H., CHEN, S., DICHTL, N., DAI, X., LI, N. Effects of thermal hydrolysis on organic matter solubilization and anaerobic digestion of high solid sludge. **Chemical Engineering Journal**, v.264, p.174–180, 2015.

YANG, Y., TADA, C., MIAH, M.S., TSUKARA, K., YAGISHITA, T., SAWAYAMA, S., Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester, **Materials Science and Engineering**, v. 24, p. 413-419, 2004.

YANG, G., WANG, J., Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44 p.25542 – 25550, 2019.

YAZAR, E., CIRIK, K., OZDEMIR, S., AKMAN, D., CUCI, Y., CINAR, O. Optimization of two-stage and single-stage anaerobic reactors treating cheese whey **Journal of Engineering Sciences**, v.19, p.25–36, 2016.

YIN, Y.N., WANG, J.L. Changes in microbial community during biohydrogen production using gamma irradiated sludge as inoculum. **Bioresource Technology**, v.200, p.217-22, 2016.

YOU, S., OK, Y.S., CHEN, S.S., TSANG, D.C.W., KWON, E.E., LEE, J., WANG, C.H. A critical review on sustainable biochar system through gasification: Energy and environmental applications. **Bioresource Technology**, v.246, p.242–253, 2017.

YU, X., WANG, Y., YI, W., CHIN, F.Y.L., TONG, Z. Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in Anaerolineae revealed by omics-based genome interpretation. **Biotechnol. Biofuels** v.9, p. 1–13, 2016.

YU, Q., SUN, C., LIU, R., YELLEZUOME, D., ZHU, X., BAI, R., LIU, M., SUN, M. Anaerobic co-digestion of corn stover and chicken manure using continuous stirred tank reactor: The effect of biochar addition and urea pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 319, p.124197, 2021.

YANG, X., TSIBART, A., NAM, H., HUR, J., EL-NAGGAR, A., TACK, F.M.G., WANG, C.H., LEE, Y.H., TSANG, D.C.W., OK, Y.S. Effect of gasification biochar application on soil quality: trace metal behavior, microbial community, and soil dissolved organic matter. **J. Hazard. Mater.** 365, 684–694, 2019.

YUAN, T.Q., XU, F., HE, J., SUN, R.C. Structural and physicochemical characterization of hemicelluloses from ultrasound-assisted extractions of partially delignified fast growing poplar wood through organic solvent and alkaline solutions. **Biotechnology Advances**; v.28, p.583-93, 2010.

YUAN, J.-H., XU, R.-K., ZHANG, H. The forms of alkalis in the biochar produced from crop residues at different temperatures. **Bioresource Technology**, v.102, p. 3488–97, 2011.

YUE, Z., TEATER, C., LIU, Y., MACLELLAN, J., LIAO, W. A sustainable pathway of cellulosic ethanol production integrating anaerobic digestion with biorefining. **Biotechnology Bioengineering**, v. 105, 1031–1039, 2010.

YUE, Z., TEATER, C., MACLELLAN, J., LIU, Y., LIAO, W. Development of a new bioethanol feedstock – anaerobically digested fiber from confined dairy operations using different digestion configurations. **Biomass Bioenergy**, v.35, p.1946–1953, 2011.

ZAIAT, M., RODRIGUES, J.A.D., RATUSZNEI, S.M., CAMARGO, E.F.M., BORZANI, W. Anaerobic sequencing batch reactors for wastewater: a developing technology. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.55, p.29-35, 2001.

ZHAO, Z., ZHANG, Y., WOODARD, T.L., NEVIN, K.P., LOVLEY, D.R. Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials. **Bioresour Technology**, v.191, p.140–5, 2015.

ZHAO, Z., ZHANG, Y., HOLMES, D.E., DANG, Y., WOODARD, T.L., NEVIN, K.P. Potential enhancement of direct interspecies electron transfer for syntrophic metabolism of propionate and butyrate with biochar in up-flow anaerobic sludge blanket reactors. **Bioresour Technol**, v. 209:148–56, 2016.

ZHAO, Z., LI, Y., QUAN, X., ZHANG, Y. Towards engineering application: Potential mechanism for enhancing anaerobic digestion of complex organic waste with different types of conductive materials, **Water Research**, v. 115, p. 266- 277, 2017.

ZHANG, P., FANG, F., CHEN, Y.P., SHEN, Y., ZHANG, W., YANG, J.X., LI, C., GUO, J.S., LIU, S.Y., HUANG, Y., LI, S., GAO, X., YAN, P., Composition of EPS fractions from suspended sludge and biofilm and their roles in microbial cell aggregation. **Chemosphere**, v. 117, p.59–65, 2014.

ZHANG, A., SHEN, J., NI, Y. Anaerobic digestion for use in the pulp and paper industry and other sectors: an introductory mini-review. **Bioresources**, v.10, p.8750–8769, 2015.

ZHANG, M., XIE, L., YIN, Z., KHANAL, S.K., ZHOU, Q. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: current status and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, p.50–62, 2016.

ZHANG, J.; FAN, C.; ZANG, L.; Improvement of hydrogen production from glucose by ferrous iron and Biochar, **Bioresource Technology**, v.245 p.98–105, 2017.

ZHANG, P., ZHENG, S., LIU, J., WANG, B., LIU, F., FENG, Y., Surface properties of activated sludge-derived biochar determine the facilitating effects on *Geobacter* co-cultures. **Water Research**, v. 142, p. 441-451, 2018.

ZHANG, L.; LIM, E.L., LOH, K.C., OK, Y.C., LEE, J.T.E., SHEN, Y., WANG, C.H., DAI, Y., TONG, W., Biochar enhanced thermophilic anaerobic digestion of food waste: Focusing on biochar particle size, microbial community analysis and pilot-scale application, **Energy Conversion and Management**, v. 209, p. 112654. 2020.

ZHENG XJ, YU HQ. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **J Environ Manage**, v.74, p. 65-70, 2005.

ZHENG, H., ZENG, R.J., ANGELIDAKI, I., Biohydrogen production from glucose in upflow biofilm reactors with plastic carriers under extreme thermophilic conditions (70C), **Biotechnol. Bioeng.** V.100 p.5, p.1034–1038, 2008.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production, **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p.35- 53, 2014.

ZHONG, J., STEVENS, D.K., HANSEN, C.L. Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v.40, p.15470–15476, 2015.

ZHOU, X., XU, J., WANG, Z., CHENG, J.J., LI, R., QU, R. Dilute sulfuric acid pretreatment of transgenic switchgrass for sugar production. **Bioresource Technology**, v.104, p.823-7, 2012.

ZHOU, M., YAN, B., WONG, J. W., ZHANG, Y. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v.248, p.68-78, 2018.

ZHU, J., ZHENG, Y., XU, F., LI, Y. Solid-state anaerobic co-digestion of hay and soybean processing waste for biogas production. **Bioresource Technology**, v.154, p. 240–24, 2014.

ZIEMIŃSKI, K., KOWALSKA-WENTEL, M., Effect of Different Sugar Beet Pulp Pretreatments on Biogas Production Efficiency, **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 181, p.1211–1227, 2017.

ZRELLI, K., GAL, O., LATOUR-LAMBERT, P., KIRWAN, L., GHIGO, J.M., BELOIN, C., Bacterial biofilm mechanical properties persist upon antibiotic treatment and survive cell death. **New Journal of Physics**, v.15, p.5026, 2013.