

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CERRO LARGO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS**  
**SUSTENTÁVEIS**

**VERA ANALISE SCHOMMER**

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETO DE SUÍNOS E PENAS DE FRANGO**  
**PRÉ-TRATADAS PARA A PRODUÇÃO DE METANO**

**CERRO LARGO**

**2019**

**VERA ANALISE SCHOMMER**

**CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETO DE SUÍNOS E PENAS DE FRANGO  
PRÉ-TRATADAS PARA A PRODUÇÃO DE METANO**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit  
Co-orientador: Prof. Dr. Bruno München Wenzel

**CERRO LARGO**

**2019**

## **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Schommer, Vera Analise

Co-digestão anaeróbia de dejetos de suínos e penas de frango pré-tratadas para a produção de metano / Vera Analise Schommer. -- 2019.

87 f.

Orientador: Dr Daniel Joner Daroit.

Co-orientador: Dr Bruno München Wenzel.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis-PPGATS, Cerro Largo, RS , 2019.

1. Biodigestão anaeróbia. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Hidrolisado de penas. 4. Pré-tratamento microbiano. 5. Modelagem cinética. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Wenzel, Bruno München, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

## VERA ANALISE SCHOMMER

### CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETO DE SUÍNOS E PENAS DE FRANGO PRÉ-TRATADAS PARA A PRODUÇÃO DE METANO

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

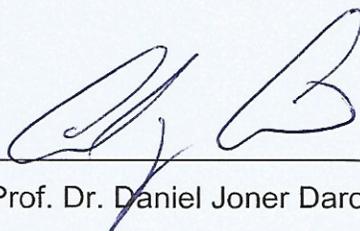
Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

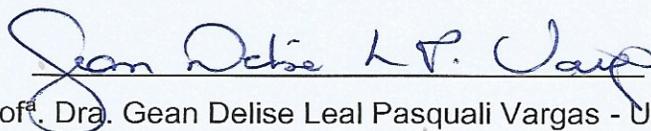
Co-orientador: Prof. Dr. Bruno München Wenzel

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 27/02/2019

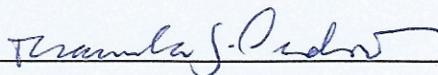
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS



Prof.ª Dra. Gean Delise Leal Pasquali Vargas - UFFS



Prof.ª Dra. Manuela Gomes Cardoso - UFFS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, meus pais Norberto (em memória) e Lúcia, pelo amor, amizade, apoio e incentivo em todas as etapas de minha vida. Aos meus irmãos Maria Eluisa e Luis Afonso pelo apoio, carinho e amizade.

Aos Prof. orientador Dr. Daniel Joner Daroit e co-orientador Dr. Bruno München Wenzel pela confiança, orientação, ajuda, apoio e disponibilidade durante todas as etapas da pesquisa.

Ao meu namorado Israel, pelo apoio, amor, amizade, companheirismo e paciência.

Aos meus amigos e colegas de caminhada acadêmica, em especial Fernanda, Julia e Carlos, pela amizade, apoio e incentivo mútuo durante o mestrado.

Aos demais professores do PPGATS, pelo aprendizado.

Às Prof<sup>as</sup>. Dra. Gean Delise Leal Pasquali Vargas e Dra. Manuela Gomes Cardoso da Universidade Federal da Fronteira Sul pelas análises realizadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis pela disponibilidade e auxílio.

## RESUMO

Diferentes substratos vêm sendo investigados quanto ao rendimento de metano durante a digestão anaeróbia (DA) e Co-DA. Dejetos de suínos e penas de frango são abundantes resíduos da cadeia produtiva da carne. Embora dejetos sejam empregados na DA, a recalcitrância das penas pode afetar o processo. Pré-tratamentos podem otimizar a aplicação de biomassas na Co-DA. Objetivou-se avaliar a produção de metano de dejetos de suínos fresco (DF) ou maturado (DM) adicionados de penas (submetidas ou não a pré-tratamento microbiano). DF (diluído 1:2) e DM (diluído 1:1) foram utilizados como inóculo/substrato principal em dois experimentos (Exp), DF e DM, respectivamente. Os co-substratos testados foram penas fragmentadas (PF) e hidrolisado de penas produzido por bactéria queratinolítica (HP); DF esterilizado foi utilizado nos controles (C) para ajuste da concentração inicial de sólidos totais (ST). No Exp DF, concentrações de 5,67% (1X) e 6,80% ST (2X) foram avaliadas; os co-substratos representaram 28,5% e 40,4% dos ST, respectivamente. No Exp DM, concentrações de 4,6% (1X) e 5,1% ST (2X) foram investigadas; os co-substratos representaram 12,1% e 20,6% dos ST. As Co-DA ocorreram a 35 °C por 82-83 dias. A produção de metano foi mensurada por deslocamento de solução alcalina. Parâmetros físico-químicos foram avaliados para inóculos, co-substratos e produtos finais. No Exp DF, a produção final de metano não foi afetada pelos co-substratos 1X (0,48 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>). Considerando a concentração 2X, o HP reduziu em 43% (0,28 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>) a produção de metano em relação a PF e C, possivelmente pelos elevados níveis de nitrogênio amoniacal. A PF (1X e 2X) não afetou o rendimento final de metano, embora tenham resultado em diminuição transitória deste parâmetro. No Exp DM, a produção de metano foi superior para o HP (1X e 2X; 0,16 e 0,19 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>, respectivamente). Contudo, PF (1X e 2X) resultaram em menores produções de metano (0,12 e 0,16 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>), sugerindo diminuída biodegradabilidade. O modelo de Gompertz modificado demonstrou o melhor ajuste à cinética da produção de metano nos experimentos em relação a outros três modelos testados. Em suma, há a possibilidade de usar PF em processos de Co-DA com DF/DM. A concentração de HP e o inóculo demonstraram ser fatores importantes para a produção de metano, tanto pela inibição da Co-DA observada com DF, quanto pelo efeito positivo no rendimento de metano usando DM. O pré-tratamento microbiano das penas representa estratégia para acelerar e aumentar a produção de metano.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia. Resíduos agroindustriais. Pré-tratamento microbiano. Hidrolisado de penas. Modelagem cinética.

## ABSTRACT

Different substrates are investigated regarding the methane yield during anaerobic digestion (DA) and Co-DA. Swine manure and chicken feathers are abundant wastes from the meat supply chain. Although swine manure is employed in DA, feathers recalcitrance could affect this process. Pre-treatments might optimize biomass applications in Co-DA. This study aimed to evaluate methane production from fresh (DF) and matured (DM) swine manures added with feathers (with or without microbial pre-treatment). DF (diluted 1:2) and DM (diluted 1:1) were employed as inocula/main substrates in two experiments (Exp), DF and DM, respectively. Evaluated co-substrates were fragmented feathers (PF) and feather hydrolysate produced by a keratinolytic bacteria (HP); sterilized DF was used as controls (C) to adjust the initial concentration of total solids (ST). In Exp DF, ST concentrations of 5.67% (1X) and 6.80% (2X) were evaluated; co-substrates represented 28.5% and 40.4% of ST, respectively. In Exp DM, ST concentrations of 4.6% (1X) and 5.1% (2X) were investigated; co-substrates represented 12.1% and 20.6% of ST. Co-DA were performed at 35 °C for 82-83 days. Methane production was measured through displacement of alkaline solution. Physico-chemical parameters were evaluated for inocula, co-substrates, and final products. In Exp DF, final methane production was not affected by 1X co-substrates ( $0.48 \text{ L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ ). For the 2X concentration, HP reduced methane production by 43% ( $0.28 \text{ L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ ) as compared to PF and C, possibly owing to elevated levels of ammonia nitrogen. PF (1X and 2X) has not affected final methane yield, although resulted in a transient decrease of this parameter. In Exp DM, methane production was superior for HP (1X and 2X;  $0.16$  and  $0.19 \text{ L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ , respectively). However, PF (1X and 2X) resulted in the lower methane productions ( $0.12$  and  $0.16 \text{ L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ ), suggesting a decreased biodegradability. The modified Gompertz model displayed a better fit to describe the kinetics of methane production in the experiments when compared to the other three models tested. In summary, there is the possibility of using PF in Co-DA processes with DF/DM. HP concentration and inoculum were important factors for methane production, as observed by Co-DA inhibition with DF, and also due to the positive effect on methane yield with DM. The microbial pre-treatment of feathers represents a strategy to accelerate and increase methane production.

Keywords: Anaerobic biodigestion. Agro-industrial wastes. Microbial pre-treatment. Feather hydrolysate. Kinetic modelling.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pré-tratamentos de biomassas visando produção de metano. ....	30
Tabela 2 - Estudos de co-digestão anaeróbia com diferentes resíduos orgânicos para a produção de metano. ....	32
Tabela 3 - Modelos cinéticos aplicados a experimentos de DA em batelada. ....	35
Tabela 4 - Composição dos reatores, com base nos ST de inóculos/substratos e co-substratos. ....	43
Tabela 5 - Modelos de produção acumulada de metano utilizados no trabalho. ....	46
Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos dos inóculos/substratos e co-substratos utilizados no processo de digestão anaeróbia. ....	49
Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos no início (t0) e ao final (tf) do processo de DA nos reatores do Exp DF. ....	52
Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos no início (T0) e ao final (Tf) do processo de DA nos reatores do Exp DM. ....	54
Tabela 9 - Informações sobre os modelos de produção acumulada de metano e dados de qualidade do ajuste para as condições de Co-DA. ....	55
Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Gompertz modificado para produção acumulada de metano no Exp DF (DF) e Exp DM (DM) com diferentes co-substratos e concentrações. ....	56
Tabela 11 - Produção final de metano nos reatores do Exp DF, e percentual de aumento da produção nos reatores HP e PF em relação aos controles (C). ....	58
Tabela 12 - Produção final de metano nos reatores do Exp DM, e percentual de aumento da produção nos reatores HP e PF em relação aos controles (C). ....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos principais processos de conversão na digestão anaeróbica. Adaptada de Chen et al. (2014). .....	23
Figura 2 - Curvas típicas de produção cumulativa de metano. Adaptada de Ware; Power (2017).....	34
Figura 3 - Resultados experimentais e preditos pelo modelo de Gompertz ( $R^2 = 0.9834$ ). .....	56
Figura 4 - Produção cumulativa de metano ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbica de dejetos frescos de suínos (DF; inóculo/substrato principal) e co-substratos em reatores com 5,67 % ST – Exp1. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 28,5 % ST (1X). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 4$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado. ....	57
Figura 5 - Produção cumulativa de metano ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbica de dejetos frescos de suínos (DF; inóculo/substrato principal) e co-substratos em reatores com 6,77 % ST – Exp DF. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 40,4 % ST (2X). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 4$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado. ....	59
Figura 6 - Produção cumulativa de metano ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbica de dejetos maturados de suínos (DM; inóculo) e co-substratos em reatores com 4,60 % ST – Exp DM. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 12,1 % ST (1X). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 4$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado.....	61
Figura 7 - Produção cumulativa de metano ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbica de dejetos maturados de suínos (DM; inóculo) e co-substratos em reatores com 5,11 % ST (2X) – Exp DM. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 20,6 % ST. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ( $n = 4$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: produção máxima de metano

ADM1: Modelo de Digestão Anaeróbia nº. 1

AICc: Critério de Akaike

C: Controle

Co-DA: Co-digestão Anaeróbia

DA: Digestão Anaeróbia

DF: Dejeito Fresco

DM: Dejeito Maturado

DQO: Demanda Química de Oxigênio

Exp DF: Experimento DF

Exp DM: Experimento DM

HP: Hidrolisado de Pena

N: Nitrogênio

$n$  : Número de Pontos Experimentais Ajustados

$np$  : Número Total de Parâmetros Ajustados

PF: Pena Fragmentada

$R^2$  : Coeficientes de determinação

ST: Sólidos Totais

SV: Sólidos Voláteis

$t_0$ : Tempo Inicial

$t_f$ : Tempo Final

TAN: Nitrogênio Amoniacal

TKN: Nitrogênio Total de Kjeldahl

$V_{CH_4}$ : volume de metano

$\mu_m$ : Velocidade Específica Máxima de Crescimento Celular

$\lambda$  : Tempo de Fase Lag

$\nu$  : Fator de Forma da Curva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 OBJETIVOS .....	15
<b>1.1.1 Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 PRODUÇÃO ANIMAL E PROBLEMÁTICAS AMBIENTAIS .....	16
<b>2.1.1 Suinocultura</b> .....	<b>16</b>
2.1.1.1 Dejeito de suínos .....	16
<b>2.1.2 Indústria avícola</b> .....	<b>17</b>
2.1.2.1 Resíduos da indústria avícola .....	18
2.1.2.2 Penas de frango .....	18
2.2 O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	20
<b>2.2.1 Etapas da biodigestão anaeróbia</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.2 Fatores que influenciam a DA e a produção de metano</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.3 Métodos de melhoramento do processo</b> .....	<b>28</b>
2.2.3.1 Pré-tratamentos de biomassas.....	28
2.2.3.2 Co-digestão .....	30
<b>2.2.4 Métodos de avaliação e modelos cinéticos do processo de DA</b> .....	<b>32</b>
2.2.4.1 Estudos cinéticos .....	33
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 PRODUÇÃO DE METANO ATRAVÉS DA CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETO DE SUÍNOS E PENAS DE FRANGO SUBMETIDAS A PRÉ-TRATAMENTO .....	37
3.2 RESUMO.....	37
3.3 PALAVRAS-CHAVE: Biodigestão anaeróbia. Resíduos agroindustriais. Pré-tratamento microbiano. Hidrolisado de penas. Modelagem cinética. ....	38
3.4 INTRODUÇÃO .....	39
3.5 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
<b>3.5.1 Inóculos, substratos e co-substratos</b> .....	<b>41</b>
3.5.1.1 Inóculos/substratos.....	41
3.5.1.2 Co-substratos .....	41

3.5.1.2.1 Controle (C) .....	41
3.5.1.2.2 Penas fragmentadas (PF).....	42
3.5.1.2.3 Hidrolisado de penas (HP).....	42
<b>3.5.2 Digestão anaeróbia para a produção de metano .....</b>	<b>42</b>
3.5.2.1 Experimento DF .....	43
3.5.2.2 Experimento DM .....	43
3.5.2.3 Condições operacionais de DA e determinação de metano .....	43
<b>3.5.3 Parâmetros físico-químicos .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.4 Modelos matemáticos para a produção acumulada de metano .....</b>	<b>45</b>
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
<b>3.6.1 Caracterização dos inóculos/substratos e co-substratos .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6.2 Caracterização físico-química (<math>t_0</math> e <math>t_f</math>) nos experimentos de Co-DA.....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.3 Produção acumulada de metano e seleção de modelo cinético .....</b>	<b>55</b>
3.7 CONCLUSÃO .....	66
3.8 REFERÊNCIAS .....	67
3.9 MATERIAL SUPLEMENTAR .....	72
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento populacional, há a necessidade de aumentar a produção de alimentos. Conforme a USDA (2017) e Embrapa (2017), o Brasil é um dos maiores produtores de carne suína e de frango do mundo. No cenário nacional, o Rio Grande do Sul está entre os três maiores estados produtores de suínos e frangos. Porém, a produção em larga escala de diversos ramos agroindustriais traz consigo a preocupação com a poluição que os resíduos sólidos e efluentes gerados podem causar.

Os resíduos da suinocultura se tornaram um problema emergencial a ser tratado em diversos países, pois a poluição causada em caso de descarte e tratamento inadequados pode afetar os solos e prejudicar os recursos hídricos (YANG *et al.*, 2016). Além da suinocultura, a cadeia de produção avícola também atrai atenção há décadas devido à poluição ambiental (LIU *et al.*, 2012). Assim, a busca por alternativas que solucionem ou mitiguem estas relevantes problemáticas ambientais apresenta-se como um dos grandes desafios destes setores produtivos (KIM *et al.*, 2013).

A digestão anaeróbia (DA) consiste em diferentes estágios, denominados de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Através destas etapas, os componentes orgânicos complexos dos resíduos são solubilizados, hidrolisados e fermentados em produtos intermediários, como oligossacarídeos, aminoácidos, glicerol e ácidos graxos de cadeia longa, que são posteriormente convertidos em uma mistura de gases, denominada biogás, contendo especialmente metano e CO<sub>2</sub> (KIM *et al.*, 2013).

Este complexo processo depende, em última análise, de três fatores principais, quais sejam, os parâmetros ambientais, características dos substratos orgânicos e as comunidades microbianas associadas à DA (BARRET *et al.*, 2013). Parâmetros como pH, teor de umidade ou concentração de substrato são condições importantes que afetam o desempenho da digestão anaeróbica (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Neste sentido, modelagens matemáticas podem ser aplicadas para retratar possíveis reações e resultados em diferentes sistemas de DA (COSTA *et al.*, 2012b).

A DA é uma alternativa amplamente utilizada para a valorização de resíduos, como os efluentes da suinocultura, que contêm altos teores de substâncias orgânicas facilmente biodegradáveis, pois combina o tratamento de resíduos à produção de um

combustível (metano) e à obtenção de um subproduto que, por seu valor nutricional, pode ser usado como fertilizante para a agricultura (BAO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2012a; DUNG *et al.*, 2014; LE HYARIC *et al.*, 2012; YUAN; ZHU, 2016). Assim, a DA apresenta diversos benefícios ambientais, como a produção de energia mais limpa, eliminação de resíduos orgânicos, proteção ambiental (através da redução de patógenos e da poluição), incentivo aos agrossistemas associados ao biogás e redução das emissões de gases de efeito estufa (MAO *et al.*, 2015).

Não necessariamente todos os tipos de materiais orgânicos residuais são adequados à DA. Particularmente, penas de frango são constituídas predominantemente por proteínas (queratinas). Na DA, as penas de frango podem ser hidrolisadas em aminoácidos e peptídeos, subsequentemente fermentados a ácidos orgânicos, amônia, compostos enxofrados, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, para então os ácidos orgânicos, o H<sub>2</sub> e o CO<sub>2</sub> serem convertidos em metano (XIA, *et al.*, 2012a).

No entanto, a bioconversão das penas é usualmente dificultada devido à insolubilidade, estabilidade e recalcitrância conferidas pelas queratinas (SALMINEN; RINTALA, 2002). Neste contexto, o pré-tratamento de biomassas e/ou a co-digestão (Co-DA) de diferentes biomassas, vêm sendo aplicados para melhorar o desempenho da DA na perspectiva de aumentar a eficiência do processo e a produção de metano. Pré-tratamentos térmicos, químicos, biológicos e mecânicos, bem como suas combinações, são alternativas para acelerar a acessibilidade e hidrólise de substratos (FERRER *et al.*, 2008). A co-digestão representa uma estratégia eficaz no intuito de favorecer sinergismos microbianos, diluir compostos inibitórios, otimizar a produção de biogás e aumentar a qualidade dos resíduos digeridos (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014).

No que se refere às penas, diversos pré-tratamentos têm sido propostos para tornar esta biomassa mais acessível à DA (FORGÁCS *et al.*, 2014; SALMINEN *et al.*, 2003), com destaque para pré-tratamentos microbianos, onde diferentes microrganismos queratinolíticos são utilizados para a hidrólise das penas (FORGÁCS *et al.*, 2011; MÉZES; TAMÁS, 2015; PATINVOH *et al.*, 2016). Contudo, a elevada concentração de nitrogênio orgânico das penas pode resultar no acúmulo de amônia em níveis tóxicos durante a DA (BUJOCZEK *et al.*, 2000). Deste modo, a Co-DA de penas com outros resíduos orgânicos também pode ser benéfica em termos de equilíbrio de nutrientes para o processo (COSTA *et al.*, 2012a). Considerando o reduzido número de publicações acerca da utilização de penas, com ou sem pré-

tratamento, em processos de DA, há cenário propício para avanços em pesquisa e desenvolvimento nesta temática.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho da digestão anaeróbia de dejetos de suínos utilizando penas de frango como co-substratos e os efeitos do pré-tratamento microbiano das penas sobre o processo de produção de metano.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Determinar propriedades físico-químicas de dejetos de suínos, de penas de frango, de penas pré-tratadas biologicamente, e do conteúdo dos reatores anaeróbios após o processo de digestão anaeróbia;

Investigar a produção de metano durante processo de digestão anaeróbia utilizando dejetos de suínos fresco como inóculo/substrato e penas, submetidas ou não a pré-tratamento microbiano, como co-substratos;

Avaliar a produção de metano durante a digestão anaeróbia de dejetos de suínos maturados como inóculo e penas, submetidas ou não a pré-tratamento microbiano, como substratos;

Selecionar modelo matemático para a descrição da cinética produção de metano nas diferentes condições de digestão anaeróbia avaliadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUÇÃO ANIMAL E PROBLEMÁTICAS AMBIENTAIS

O crescimento populacional e as crises econômicas enfrentadas levaram a uma demanda acentuada por carnes e produtos derivados disponíveis a custos mais baixos (ASTALS *et al.*, 2011). Contudo, os resíduos da produção animal e do processamento para obtenção de carne contribuem consideravelmente para a poluição, podendo afetar a dinâmica dos habitats terrestres e contaminação dos recursos hídricos (LIU *et al.*, 2012). Com o reconhecimento destes problemas ambientais e de sua tendência de aumento, mais indústria e entidades governamentais demonstram preocupação com a poluição. Neste sentido, tecnologias ambientalmente adequadas e limpas, além do uso mais eficiente da energia, têm sido apoiados (JOBARD *et al.*, 2015). Dentre os diversos seguimentos industriais que produzem grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos, destacam-se as agroindústrias de processamento de carnes suína e de frango, as quais são abordadas nas seções seguintes.

#### 2.1.1 Suinocultura

Conforme dados da Embrapa (2017), o Brasil possuía mais de 2 milhões de matrizes suínas em 2016. O país é o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo, sendo produzidas 3,76 milhões de toneladas de carcaças de suínos em 2017. A China é o maior produtor, consumidor e importador de carne suína no mundo.

No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro Geografia e Estatística (IBGE, 2018) a região Sul produz e exporta mais da metade da carne suína do país. O Rio Grande do Sul é o terceiro maior estado produtor, com 19 % da produção nacional. Porém, quando se trata de exportação, o Rio Grande do Sul é o segundo maior, com 29 % da exportação nacional.

##### 2.1.1.1 Dejeito de suínos

A produção de suínos em confinamento gera resíduos, sendo o dejetos de suínos um dos principais. Conforme dados da Embrapa (TUMELERO, 1998), a produção média de dejetos líquidos por suíno em estágio de terminação é de 7 L dia<sup>-1</sup>. O armazenamento convencional e a aplicação deste efluente como fertilizante gera grande preocupação ambiental, devido às emissões de gases de efeito estufa, contaminação do solo, e à poluição de águas superficiais e subterrâneas devido à lixiviação de nutrientes (FIERRO *et al.*, 2014a).

A digestão anaeróbia (DA) de dejetos da produção animal apresenta-se como alternativa para a destinação destes efluentes (SAKAR *et al.*, 2009). Dentre os resíduos da pecuária, o dejetos suíno possui altas quantidades de água e capacidade tamponante. Além disso, o dejetos suíno é um substrato complexo que contém matéria orgânica não dissolvida e dissolvida, como polissacarídeos, lipídios, proteínas e ácidos graxos voláteis, além de uma ampla variedade de nutrientes favoráveis ao crescimento de microrganismos anaeróbios (CÓRDOBA *et al.*, 2016). Tais propriedades, somadas à uma microbiota autóctone apropriada, tornam os dejetos suínos propícios para uso como inóculos e/ou substratos para a DA (SAKAR *et al.*, 2009).

De fato, dejetos de suínos são largamente empregados nestes bioprocessos (BARRET *et al.*, 2013; HANSEN *et al.*, 1998), como promissor substrato e fonte de inóculo (CÓRDOBA *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2015a; XIA *et al.*, 2012a; 2012b). A DA de diferentes dejetos oriundos da criação de animais é muitas vezes dificultada pela inibição da amônia livre, resultando em baixos rendimentos de metano e, conseqüentemente, longos tempos de retenção (BOE; ANGELIDAKI, 2009). Neste sentido, diversos estudos relatam o uso de dejetos como co-substratos em processos de codigestão-anaeróbia (FIERRO *et al.*, 2014b; LI *et al.*, 2016).

### **2.1.2 Indústria avícola**

Dados da Embrapa (2017) mostram que, em 2016, o Brasil possuía mais de 50 milhões de matrizes de corte. O país é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, tendo abatido 5,84 bilhões de cabeças, representando 13 milhões de toneladas de carcaças no ano de 2017. Além disso, é o maior exportador mundial deste tipo de carne, com 3,8 milhões de toneladas exportadas em 2017. Conforme dados do IBGE (2018), a região Sul é a maior produtora e exportadora da carne de

frango brasileira, correspondendo a mais de 50%, sendo o Rio Grande do Sul o segundo maior produtor e terceiro maior exportador nacional.

#### 2.1.2.1 Resíduos da indústria avícola

A indústria avícola em seu processo produtivo resulta em uma grande quantidade de resíduos sólidos, tanto nas instalações de produção, quanto nas plantas de processamento. Especialmente, o processamento das aves para a produção de carne contribui sobremaneira para a produção de resíduos (BRANDELLI *et al.*, 2015). De fato, 27-37% do peso vivo destes animais são considerados resíduos gerados por essa indústria (WARE; POWER, 2017). Dentre aos principais resíduos orgânicos sólidos destacam-se as penas oriundas do processo de depenagem, resíduos intestinais ou miudezas do processo de evisceração, bem como cabeças, sangue, pés e aparas de carne, entre outros (COSTA *et al.*, 2012; SALMINEN; RINTALA, 2002; YOON *et al.*, 2014).

#### 2.1.2.2 Penas de frango

O crescimento da indústria avícola resultou no aumento da geração de resíduos sólidos orgânicos. As penas fazem parte destes resíduos e representam entre 5 a 10% do peso corporal dos frangos (COSTA *et al.*, 2012a; ONIFADE *et al.*, 1998; SALMINEN; RINTALA, 2002). Desta forma, a partir das estimativas de abate e peso de carcaças da Embrapa (2017), cerca de 650 mil toneladas de penas foram produzidas como resíduos em 2017.

As penas são apêndices epidérmicos constituídos majoritariamente por proteínas denominadas queratinas, que correspondem a 85-90% da massa das penas (BRANDELLI *et al.*, 2015; ONIFADE *et al.*, 1998; PAPADOPOULOS, 1985). As queratinas são proteínas estruturais insolúveis, onde as cadeias polipeptídicas são fortemente compactadas e altamente estáveis devido à presença de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CORRÊA *et al.*, 2010; DAROIT *et al.*, 2009). Essa estrutura torna as penas altamente resistentes a estresses mecânicos, atuação de compostos químicos e mesmo à biodegradação nos ambientes, potencialmente representando relevante empecilho para a reciclagem destes resíduos (PATINVOH *et al.*, 2017).

Dentre as alternativas para o descarte destes resíduos tem-se o processo de incineração que é uma tecnologia empregada para a destruição térmica das penas, sendo obviamente eficiente para destruir agentes patogênicos (RITTER; CHIRNSIDE, 1995). Porém, no processo de incineração ocorrem emissões atmosféricas que juntamente com as condições do processo e o descarte de resíduos sólidos e líquidos precisam ser estritamente controlados (SALMINEN; RINTALA, 2002). Outra alternativa é a disposição destes resíduos em aterros sanitários, que por sua vez devem prevenir ou reduzir seus efeitos adversos no meio ambiente, particularmente a poluição das águas superficiais, subterrâneas, do solo e do ar. Além da área necessária para a disposição em aterro, todas estas medidas para evitar contaminação ambiental aumentam os custos desta estratégia de descarte (SALMINEN; RINTALA, 2002).

Como as penas são uma biomassa abundante, de baixo custo e amplamente disponível, processos tecnológicos alternativos vêm sendo investigados para sua valorização e reciclagem. Penas tratadas hidrotermicamente vêm sendo incorporadas na alimentação animal. No entanto, os produtos obtidos apresentam baixa digestibilidade e valor nutricional restrito; ainda, a legislação vem se tornando rigorosa quanto ao uso de subprodutos de abate na ração animal, devido ao risco de transmissão de doenças via alimentos e cadeia alimentar (FAKHFAKH *et al.*, 2011; KELLEHER, 2002; SALMINEN; RINTALA, 2002). Os subprodutos e resíduos de aves podem conter várias espécies diferentes de microrganismos, incluindo patógenos potenciais, como *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Clostridium* sp. (SALMINEN; RINTALA, 2002).

A conversão das penas e de outros resíduos ricos em queratina em hidrolisados proteicos através de hidrólise ácida, hidrólise alcalina e outros métodos físico-químicos, pode afetar negativamente a qualidade dos produtos obtidos, pois usualmente resultam na degradação de aminoácidos essenciais, e os efluentes resultantes destes processos pode ser problemáticos para seu tratamento e destinação (PATINVOH *et al.*, 2017).

A utilização das penas como substratos por microrganismos queratinolíticos representa uma tecnologia microbiana viável para sua degradação. Diversos microrganismos produzem enzimas que podem hidrolisar queratinas e torná-las solúveis. Dentre os microrganismos eficientes para a degradação de penas de frango podem ser citadas algumas bactérias do gênero *Bacillus* (CALLEGARO *et al.*, 2018;

CORRÊA *et al.*, 2010; FORGÁCS *et al.*, 2011; ZAGHLOUL *et al.*, 2011) e fungos do gênero *Aspergillus* (MAZOTTO *et al.*, 2013). A partir da bioconversão microbiana podem ser obtidas enzimas proteolíticas, biomassa microbiana e hidrolisados proteicos (DAROIT *et al.*, 2009; FONTOURA *et al.*, 2018).

A digestão anaeróbica de resíduos ricos em queratina para a produção de biogás é pouco explorada (XIA *et al.*, 2015). Em estudos onde é assumido que toda a proteína insolúvel (queratina) seria convertida em proteína solúvel, o potencial teórico de produção de metano dos resíduos de queratina é de aproximadamente  $0,35-0,50 \text{ Nm}^3 (\text{kg VS})^{-1}$ . No entanto, a produção de metano obtida é geralmente baixa devido à estrutura recalcitrante das queratinas (COSTA *et al.*, 2012a; PATINVOH *et al.*, 2017).

Penas de frango foram investigadas como substrato em processos de DA, onde verificou-se que poderiam ser digeridas (XIA *et al.*, 2012a; 2012b). Contudo, pelo elevado teor de proteínas e aminoácidos, a degradação das penas pode resultar em elevada produção de amônia, que é reconhecidamente tóxica para microrganismos da DA (ABOUELENIEN *et al.*, 2010; NIE *et al.*, 2015). Assim, as penas de frango representam desafios para a digestão anaeróbica (SALMINEN; RINTALA, 2002).

Estudos demonstram que a co-digestão anaeróbia de resíduos de avicultura com outros resíduos orgânicos, tais como resíduos e efluentes agroindustriais, poderia ser utilizada no intuito de alcançar um balanço adequado de nutrientes, bem como aumentar a produção específica de metano (FORGÁCS; LUNDIN, 2013; WANG *et al.*, 2012; ZAHAN *et al.*, 2018). Além disso, pré-tratamentos adequados podem beneficiar a utilização das penas em processos de DA. Neste sentido, pré-tratamentos microbianos de resíduos ricos em queratina vêm sendo reportado como alternativa promissora (FORGÁCS *et al.*, 2011; PATINVOH *et al.*, 2016).

## 2.2 O PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia (DA) consiste na degradação biológica de substratos orgânicos por microrganismos em um ambiente anaeróbio (livre de oxigênio). Em outras palavras, a DA é um processo de múltiplas fases no qual substratos orgânicos complexos são convertidos nas formas mais oxidadas e reduzidas de carbono monoatômico, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e o metano ( $\text{CH}_4$ ), respectivamente (BATSTONE; VIRDIS, 2014). O  $\text{CH}_4$  e o  $\text{CO}_2$  são os principais componentes da

mistura de gases oriunda da DA, comumente denominada de biogás. Contudo, outros gases, incluindo nitrogênio, hidrogênio, sulfeto de hidrogênio, amônia e vapor de água também compõem o biogás, usualmente em volumes diminutos (NESHAT *et al.*, 2017).

Desta forma, técnicas anaeróbicas de digestão de biomassas residuais resultam em uma fonte de energia com base no uso do metano gerado por meio deste processo (BATSTONE; VIRDIS, 2014; JOBARD *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012). Além da produção de biogás, o resíduo digerido pode ser usado como fertilizante agrícola (LE HYARIC *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016). A produção de bioenergia a partir da DA é considerada uma tecnologia sustentável de tratamento de resíduos orgânicos (RAJAGOPAL *et al.*, 2013). Considerando o aumento da demanda por energia renovável, aliado à proteção ambiental, a DA têm atraído interesses e soma de esforços consideráveis na comunidade científica (MAO *et al.*, 2015). Áreas de aplicação do biogás estão se expandindo devido à disponibilidade de novas tecnologias e à necessidade de conservação e recuperação de energia e nutrientes (BATSTONE; VIRDIS, 2014).

Além da produção de energia, a DA vem sendo cada vez mais utilizada para tratar diversos resíduos devido a outras vantagens em relação aos tratamentos aeróbicos, como a baixa produção de lodo e reduzidas demandas energéticas (CHEN *et al.*, 2014). A DA oferece assim uma alternativa econômica para o tratamento de resíduos orgânicos. Diversos tipos de biodigestores anaeróbicos vêm sendo instalados em fazendas, por exemplo, como um meio de resolver problemas ambientais, como forma de produção de energia, e mesmo como uma fonte de receita adicional (HWANG *et al.*, 2010).

Há grande potencial na produção de biogás a partir biomassas residuais geradas em abundância. Resíduos derivados da agricultura e pecuária (PALATSI *et al.*, 2011; RESCH *et al.*, 2011), resíduos urbanos e de aterros sanitários (SILVESTRE *et al.*, 2015), resíduos alimentares (HAAG *et al.*, 2015; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014), biomassa de organismos aquáticos (HAAG *et al.*, 2015) e materiais lignocelulósicos (SONG *et al.*, 2012) vêm sendo investigados como matérias-primas em processos de DA. No entanto, diversas biomassas apresentam lentas taxas de decomposição e, desta forma, exigem tempos de retenção mais longos. Além disso, algumas dessas matérias-primas formam intermediários tóxicos ou até mesmo

contêm compostos tóxicos, que inibem o processo de produção de biogás (PATINVOH *et al.*, 2017).

Os efeitos das mudanças nos parâmetros operacionais e ambientais sobre o desempenho e estabilidade do processo, aspectos relativos à inibição e toxicidade, modelagem e otimização, a microbiologia do processo e a recuperação de biogás são focos contínuos de pesquisa e desenvolvimento (YENIGÜN; DEMIREL, 2013).

### **2.2.1 Etapas da biodigestão anaeróbia**

A DA consiste em uma série de processos microbianos (HWANG *et al.*, 2010). Consórcios bacterianos, que compreendem diferentes espécies de microrganismos são responsáveis pela DA e produção de biogás. Alguns autores retratam a DA como um processo que ocorre em três etapas, a hidrólise, a acidogênese (também chamada de fermentação), e a metanogênese (NESHAT *et al.*, 2017). Contudo, outros descrevem a DA em quatro etapas, sendo estas a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese (VAVILIN *et al.*, 2008). Esta última abordagem foi adotada para a descrição das etapas da DA (Figura 1).

Na hidrólise, os microrganismos liberam uma variedade de enzimas extracelulares que hidrolisam compostos orgânicos complexos, como carboidratos, proteínas e gorduras, em produtos solúveis, como glicose, aminoácidos e ácidos orgânicos de cadeia longa (CHEN *et al.*, 2014; HWANG *et al.*, 2010). A hidrólise de polímeros insolúveis é um processo relativamente lento, geralmente considerada como limitante da taxa das etapas subsequentes (FERNANDES *et al.*, 2009; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). No entanto, considerando todos os componentes solúveis, a metanogênese passa a ser considerada como a etapa limitante da DA (APPELS *et al.*, 2008).

Microrganismos acidogênicos metabolizam os produtos da hidrólise para produzir vários ácidos graxos voláteis de cadeia curta, álcoois, aldeídos e gases como o CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>. A etapa de acidogênese é realizada por um grupo muito diverso de bactérias, sendo a maioria estritamente anaeróbicas, ou seja, a presença de oxidantes como oxigênio ou nitrato é tóxica (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014).

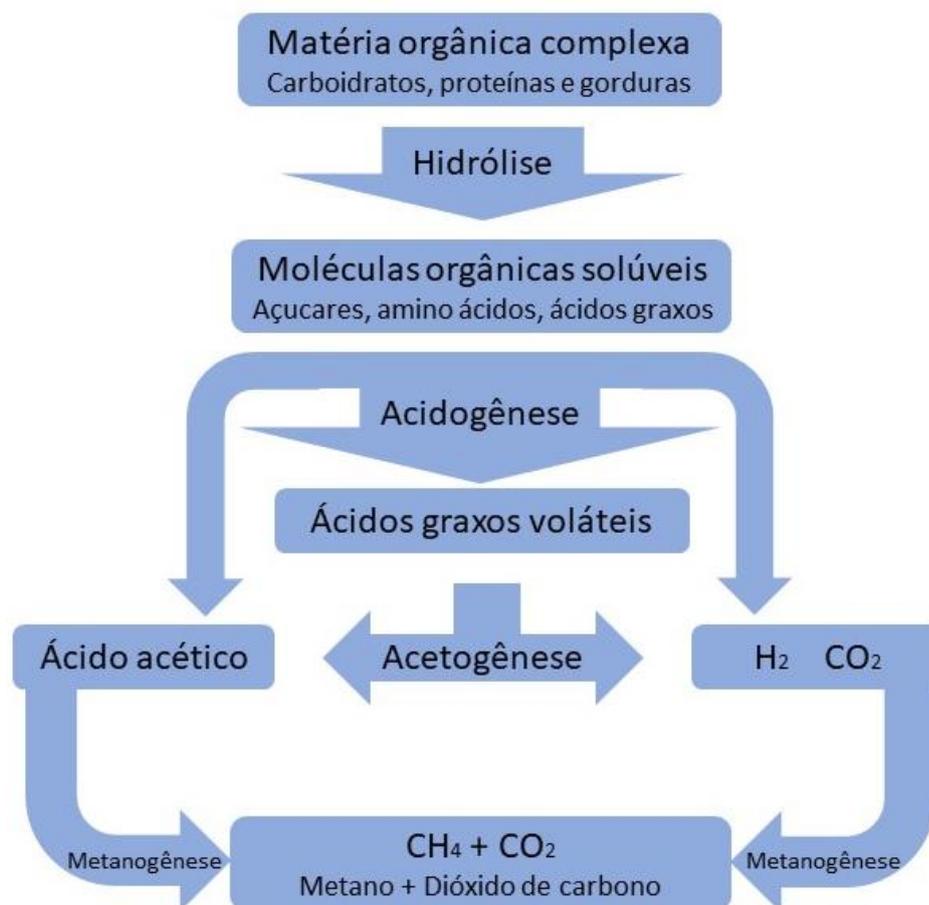


Figura 1 – Representação esquemática dos principais processos de conversão na digestão anaeróbica. Adaptada de Chen et al. (2014).

Na acetogênese, os produtos da acidogênese são convertidos em ácido acético,  $H_2$  e  $CO_2$  por bactérias acetogênicas. Estas bactérias necessitam de baixas concentrações de hidrogênio; portanto a produção excessiva de hidrogênio na acidogênese pode inibir essas bactérias (PATINVOH *et al.*, 2017).

As três primeiras etapas da DA são frequentemente agrupadas como fermentação ácida. É importante notar que nenhum material orgânico é removido da fase líquida, sendo apenas transformados em uma forma adequada como substrato para o processo subsequente de metanogênese (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). Se a matéria-prima tiver uma baixa capacidade de tamponamento e a taxa de carregamento orgânico for alta, o acúmulo de ácidos graxos voláteis pode resultar em uma queda de pH, o que inibiria os metanogênicos na etapa final (PATINVOH *et al.*, 2017).

Finalmente, a metanogênese representa a etapa final da DA, que ocorre sob condições anaeróbicas estritas demandadas pelas bactérias metanogênicas do

Domínio Archaea. Estes microrganismos produzem principalmente CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> a partir dos produtos das fases acidogênica e acetogênica (BARRET *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; HWANG *et al.*, 2010; PATINVOH *et al.*, 2017). É nesta fase que o material orgânico será removido (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014).

A metanogênese é realizada por bactérias metanogênicas tanto acetoclásticas quanto hidrogenotróficas. No primeiro grupo, o acetato é convertido em metano e gás carbônico, enquanto que no segundo grupo o metano é produzido pela utilização do gás carbônico como acceptor de elétrons derivados do gás hidrogênio (PATINVOH *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018). Geralmente, cerca de 70% do rendimento de CH<sub>4</sub> em um reator DA é devido à clivagem do acetato (metanogênese acetoclástica), e os 30% restantes derivam da via hidrogenotrófica (AQUINO *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2018).

Os grupos metanogênicos pertencentes ao Domínio Archaea são conhecidos por apresentar comportamentos de crescimento e atividade muito sensíveis em relação a diferentes substratos e condições de operação. A constituição de uma comunidade metanogênica estável determina o sucesso ou colapso em sistemas de DA com elevada carga orgânica e compostos tóxicos altamente concentrados. Desta forma, o manejo adequado da fase metanogênica tem sido determinante na operação bem-sucedida da maior parte dos processos de DA (KIM *et al.*, 2013).

A energia livre exaurida das reações é utilizada em pequena parcela para a síntese da biomassa microbiana. Portanto, considerável fração da matéria orgânica digerida é convertida em biogás (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014).

### **2.2.2 Fatores que influenciam a DA e a produção de metano**

A DA é um processo complexo e sensível que envolve diversos microrganismos que operam em condições ambientais extremas, sendo que variados fatores afetam a produção de CH<sub>4</sub>, o que torna complicada a predição do metano produzido através deste processo. Para uma DA eficiente, com redução da matéria orgânica e geração de metano, há diversas dificuldades a serem solucionadas, como o baixo rendimento de metano, o longo tempo de retenção e a instabilidade do processo, fatores que muitas vezes restringem a aplicação da DA (YUAN; ZHU, 2016).

A qualidade e a quantidade de inóculos são fatores-chave que determinam a duração da partida, a operação e o desempenho de reatores anaeróbios. Diferentes tipos de inóculo têm sido utilizados na digestão anaeróbica mesofílica, como dejetos

da pecuária e lodo de esgoto, que demonstraram boa qualidade devido à elevada carga microbiana e conteúdo de bactérias metanogênicas (CÓRDOBA *et al.*, 2016). Raposo *et al.*, (2011) indicam que a fonte, concentração, atividade, pré-incubação e aclimação são parâmetros importantes que influenciam no resultado da DA. Qualquer perturbação no processo de DA pode causar mudanças no tipo de microrganismos dominantes e na população de microrganismos, que serão refletidas no desempenho do reator anaeróbio (CÓRDOBA *et al.*, 2016).

O tipo e a estrutura (qualidade) dos substratos utilizados afetam a eficiência da DA e produção de metano (HAGOS *et al.*, 2017). Ainda, a taxa de carregamento orgânico é um fator importante para a viabilidade dos microrganismos e sua atividade ótima. O abastecimento de uma grande quantidade de materiais orgânicos no sistema de uma só vez pode levar a um conflito que é devido a uma maior atividade de hidrólise e bactérias acidogênicas em comparação com as metanogênicas (NESHAT *et al.*, 2017).

Durante a DA convencional, o conteúdo de sólidos totais (ST) no substrato orgânico é geralmente controlado na faixa de 2% a 5% (LIU *et al.*, 2016). Grande parte dos ST são sólidos voláteis (SV), que juntamente com a demanda química de oxigênio (DQO) são indicadores da abundância de matéria orgânica do substrato, o que por sua vez é favorável para a produção de metano (CÓRDOBA *et al.*, 2016).

A água é fundamental para o processo de DA, pois dissolve nutrientes e substratos e é fundamental para a atividade bacteriana (LE HYARIC *et al.*, 2012). Além disso, promove a hidrólise do substrato e permite a transferência de produtos de hidrólise e outros intermediários aos sítios bacterianos. A falta de água livre resulta em restrição do comportamento difusivo e na correspondente baixa eficiência de transferência molecular (LIU *et al.*, 2016).

O pH também afeta a DA e a eficiência do processo. Microrganismos que participam da acidogênese são relativamente menos sensíveis ao pH, tolerando uma faixa de pH entre 4,0 a 8,5; o pH ideal para hidrólise e acidogênese é entre 5,5 e 6,5 (KWIETNIEWSKA; TYS, 2014). As bactérias metanogênicas são muito sensíveis a variações de pH, com valores ótimos em torno de pH 7,0, mas atuando efetivamente entre a faixa de pH de 6,8 a 8,2 (HAGOS *et al.*, 2017; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014; MAO *et al.*, 2015).

A alcalinidade, definida como a capacidade de uma solução aquosa em neutralizar ácidos, é um parâmetro importante no desempenho dos processos de DA.

Substratos com elevada alcalinidade podem manter o pH próximo à neutralidade apesar da produção de CO<sub>2</sub> (ácido carbônico na fase líquida) e ácidos graxos voláteis. Dejetos de animais têm alta capacidade alcalina, tornando-os substratos adequados para a DA (NESHAT *et al.*, 2017).

A DA consiste em uma série de processos microbianos que podem ocorrer sob condições psicrófilicas (< 20 °C), mesofílicas (25-40 °C) ou termofílicas (50-65 °C). Variações de temperatura dentro de cada uma destas condições afetam a taxa de decomposição e produção de biogás (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). Os microrganismos que realizam a DA são muito sensíveis às mudanças de temperatura que afetam a produção de hidrogênio e metano e a decomposição de materiais orgânicos (MAO *et al.*, 2015). À medida que a temperatura operacional diminui pode haver diminuição considerável da atividade microbiana e afetar a eficiência do tratamento. Conforme a temperatura é elevada ocorre o aumento da remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e da produção de CH<sub>4</sub> (DENG *et al.*, 2014). A temperatura também afeta equilíbrios iônicos, solubilidade, transferência de gases, entre outros (NESHAT *et al.*, 2017).

O nitrogênio (N) é um dos principais nutrientes para o crescimento de microrganismos. Enquanto que baixos teores de N limitam as populações microbianas, resultando em maiores períodos para a digestão do carbono orgânico, o excesso de N também pode causar problemas (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014). Resíduos de origem animal geralmente contêm concentrações elevadas de nitrogênio amoniacal, bem como ureia e proteínas a partir das quais há rápida liberação de amônia durante a biodegradação da matéria nitrogenada na DA (LIU *et al.*, 2012).

O íon amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e a amônia livre (NH<sub>3</sub>) são as duas principais formas de nitrogênio inorgânico na DA. Baixa concentração de nitrogênio amoniacal (500 mg L<sup>-1</sup>) pode resultar na redução da produção de metano, perda de biomassa e perda da atividade metanogênica. A influência negativa da baixa concentração de nitrogênio amoniacal na biomassa é provocada não apenas pela baixa capacidade de tamponamento, mas também pela insuficiência de nitrogênio como nutriente para o crescimento microbiano (RAJAGOPAL *et al.*, 2013).

No entanto, elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal podem resultar em inibição da DA. Embora ambas as formas (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NH<sub>3</sub>) possam causar inibição, a instabilidade em um sistema de DA está majoritariamente associada à inibição causada pela amônia (LIU *et al.*, 2012; RAJAGOPAL *et al.*, 2013; ZEEMAN *et al.*,

1985). Neste sentido, as bactérias metanogênicas são as principais afetadas (JIN *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2018; YENIGÜN; DEMIREL, 2013). A amônia difunde rapidamente através da membrana plasmática das bactérias, sendo convertida em  $\text{NH}_4^+$ , o que causa desbalanço de prótons e aumento do pH intracelular, enquanto que o  $\text{NH}_4^+$  intracelular inibe enzimas da metanogênese (CHEN *et al.*, 2014). A inibição desta etapa da DA resulta em acúmulo de ácidos graxos voláteis produzidos nas etapas de acidogênese e acetogênese que, além de causar declínio no pH, também apresentam efeito tóxico sobre a microbiota (HANSEN *et al.*, 1998; KOSTER; LETTINGA, 1984; RAJAGOPAL *et al.*, 2013).

Concentrações de nitrogênio amoniacal total variando de 2.500 a 11.000  $\text{mg L}^{-1}$  são relatadas como causadoras de toxicidade para culturas metanogênicas (YANG, *et al.*, 2018). A concentração total de amônia maior que 4.000  $\text{mg NH}_3 \text{L}^{-1}$  mostrou ser inibitória durante a DA do esterco de bovinos (MASSÉ *et al.*, 2014). As diferentes faixas de inibição por amônia podem ser atribuídas às diferenças de substratos e inóculos, condições ambientais (temperatura, pH) e períodos de aclimação (CHEN *et al.*, 2008; YENIGÜN; DEMIREL, 2013). Para processos de DAs operados em pH 7,0 e 35 °C, a amônia livre representa menos de 1% da amônia total; entretanto, na mesma temperatura, mas em pH 8,0, a amônia livre aumenta para 8-10% (CHEN, *et al.*, 2014; RAJAGOPAL *et al.*, 2013). Tem sido relatado que os metanogênicos são capazes de se adaptar a altas concentrações de amônia, quando estas aumentam lentamente por longos períodos (ANGENENT *et al.*, 2002).

As concentrações de carbono e nitrogênio indicam o desempenho do processo de DA. Enquanto que o carbono atua como fonte de energia dos microrganismos, o nitrogênio desempenha papel no aumento das populações. Baixas relações carbono/nitrogênio (C/N) podem levar à formação e acúmulo de altas concentrações de amônia que são tóxicas aos metanogênicos, causando inibição do processo, ou seja, o uso ineficiente das fontes de carbono (RAJAGOPAL *et al.*, 2013). O efeito desta inibição pode ser controlado por diluição (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014) ou co-digestão com resíduos deficientes em nitrogênio para equilibrar a relação (COSTA *et al.*, 2012a).

Uma alta relação C/N induz uma baixa taxa de solubilização de proteínas e leva a baixas concentrações de nitrogênio amoniacal total (TAN) e amônia livre dentro de um sistema anaeróbio; assim, a inibição da amônia pode ser evitada melhorando a relação C/N no sistema DA. Contudo, com relações C/N excessivamente altas, não

há fornecimento suficiente de nitrogênio para manutenção da biomassa celular, ocasionando o rápido consumo do N pelos microrganismos, resultando em menor produção de biogás (MAO *et al.*, 2015). A relação C/N ótima para a digestão anaeróbica varia entre 15/1 e 35/1, com uma proporção de 25/1 sendo a mais comumente no início de processos de DA (HAGOS *et al.*, 2017; HILLS, 1979; MAO *et al.*, 2015; NESHAT *et al.*, 2017; RESCH *et al.*, 2011).

O uso de moléculas oxidadas de enxofre como aceptores de elétrons por bactérias redutoras de sulfato (BRS), produzindo H<sub>2</sub>S, pode afetar as etapas da DA. Em altas concentrações de sulfato, as BRS competem pelos substratos/produtos da DA, convertendo-os em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S, portanto reduzindo o rendimento de metano. Ainda, o H<sub>2</sub>S produzido pode inativar vários microrganismos, como os metanogênicos, em concentrações tão baixas quanto 50 mg L<sup>-1</sup> (CHEN *et al.*, 2014; NESHAT *et al.*, 2017).

Ainda, uma variedade de substâncias inibitórias e produtos intermediários são fatores preponderantes para a obtenção de resultados insatisfatórios ou mesmo o colapso da DA (YUAN; ZHU, 2016). Variações consideráveis quanto às concentrações inibitórias/tóxicas são reportadas para a maioria destas substâncias. A principal razão para essas variações é a complexidade do processo, em que mecanismos como antagonismo, sinergismo, aclimatação e complexação podem influenciar na inibição do bioprocessamento (CHEN *et al.*, 2008). Embora diversas investigações venham sendo realizadas para identificar inibidores e seu mecanismo de atuação (CHEN *et al.*, 2014), o comportamento da comunidade metanogênica é pouco conhecido, bem como o desempenho do processo em diferentes escalas de operação da DA (KIM *et al.*, 2013).

### **2.2.3 Métodos de melhoramento do processo**

#### **2.2.3.1 Pré-tratamentos de biomassas**

O biogás é comumente produzido utilizando substratos orgânicos que estão biodisponíveis para a comunidade microbiana. Na teoria, o biogás pode ser produzido a partir da fração orgânica de diferentes materiais, como resíduos lignocelulósicos e de culturas agrícolas, penas de frango, resíduos industriais, de alimentos, entre outros. Porém, as principais razões para alguns substratos não serem ideais para a produção de biogás residem na ausência de microrganismos capazes de digeri-las,

na dificuldade de degradação por microrganismos, a presença de inibidores na matéria-prima ou a produção de compostos inibitórios durante a degradação microbiana (PATINVOH *et al.*, 2017).

Ao encontro disso, diversos pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos de biomassas vêm sendo investigados (Tabela 1). Os principais efeitos benéficos dos pré-tratamentos são a redução do tamanho das partículas, e melhorias da solubilização e biodegradabilidade; contudo, a formação de compostos refratários/tóxicos e perda de matéria orgânica durante o pré-tratamento representam efeitos nocivos para a DA (CARLSSON *et al.*, 2012).

Logo, os pré-tratamentos objetivam facilitar a digestão e a hidrólise, tornando o conteúdo orgânico do substrato mais acessível aos microrganismos, diminuindo o tempo de DA e aumentando a produção de biogás (PATINVOH *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016).

Os pré-tratamentos físicos incluem principalmente procedimentos mecânicos, ultrassônicos e térmicos. Já os pré-tratamentos biológicos incluem técnicas de utilização de microrganismos e enzimas, que podem promover a hidrólise do substrato e aumentar a taxa de digestão anaeróbica (REN *et al.*, 2018). Pré-tratamentos químicos, como ozonização e hidrólise alcalina, também vêm sendo propostos; porém, o custo dos produtos químicos e a poluição ambiental causada por tais agentes são desvantagens deste pré-tratamento (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014; NESHAT *et al.*, 2017). Combinações de pré-tratamentos também vêm sendo investigadas, como no caso de processos termo-químicos (PATOWARY; BARUAH, 2018; RAFIQUE *et al.*, 2010; VENTURIN *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Pré-tratamentos de biomassas visando produção de metano.

Método	Biomassa pré-tratada	Procedimento	Referência
Físico	Mistura de frutas, vegetais e papel	Ultrassom	Zeynali <i>et al.</i> (2017)
	Resíduos alimentares	Mecânico (fragmentação)	Izumi <i>et al.</i> (2010)
	Palhas de trigo, arroz e cevada e caule de milho	Mecânico ou Térmico	Menardo <i>et al.</i> (2012)
	Penas de frango	Hidrotérmico	Forgács <i>et al.</i> (2013); Salminen <i>et al.</i> (2003)
Químico	Dejeto suíno	Hidrólise alcalina	Rafique <i>et al.</i> (2010)
	Resíduos lignocelulósicos	Uso de álcalis, ácidos, ácidos orgânicos, solventes orgânicos	Pellera; Gidaracos, (2018)
	Lodo ativado residual Penas de frango	Alcalinização Hidrólise alcalina	Zhang <i>et al.</i> (2010) Costa <i>et al.</i> (2012a); Forgács <i>et al.</i> (2014); Salminen <i>et al.</i> (2003)
Biológico	Efluente de abatedouro de aves	Enzimático (hidrolases)	Valladão <i>et al.</i> (2007)
	Gordura de resíduos alimentares	Enzimático (lipases)	Meng <i>et al.</i> (2017)
	Lodo de esgoto primário	Fermentação semi-aeróbia	Peces <i>et al.</i> (2016)
	Resíduos de mandioca e efluente de destilaria	Cultivos com consórcio microbiano celulolítico	Zhang <i>et al.</i> (2011)
	Resíduos sólidos urbanos	Fermentação em estado sólido com fungo celulolítico	Mutschlechner <i>et al.</i> (2015)
	Penas de frango	Cultivos com bactérias queratinolíticas  Enzimático (proteases)	Forgács <i>et al.</i> (2011); Mézes; Tamás, (2015); Patinvoh <i>et al.</i> (2016)  Forgács <i>et al.</i> (2013); Salminen <i>et al.</i> (2003)

### 2.2.3.2 Co-digestão

Muitas matérias-primas de fácil degradação não são amplamente disponíveis e, em alguns casos, há problemas associados ao uso de pré-tratamentos. Desta forma, a co-digestão anaeróbia (Co-DA) de diferentes biomassas representa uma boa estratégia para aumentar a quantidade de biogás produzido (PATINVOH *et al.*, 2017).

A coexistência de diferentes tipos de resíduos orgânicos na mesma área geográfica pode permitir uma gestão integrada, com benefícios ambientais consideráveis (HAGOS *et al.*, 2017).

A Co-DA de diferentes resíduos pode melhorar o equilíbrio de nutrientes e causar efeitos de sinergia nos processos microbianos, superando os déficits de substrato (JIMÉNEZ *et al.*, 2015). Matérias-primas recalcitrantes ou contendo compostos prejudiciais, e substratos ricos em proteínas, muitas vezes resultam em processos lentos e em baixo rendimento de biogás. Assim, a degradação pode ser acelerada através da Co-DA de diferentes matérias-primas com uma razão de mistura apropriada. No entanto, devem ser consideradas a relação C/N, presença de inibidores, biodegradabilidade da matéria-prima e o conteúdo total de sólidos, visando o equilíbrio nutricional para os processos microbianos (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014; NESHAT *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2018). A Tabela 2 apresenta investigações acerca da Co-DA de diferentes biomassas.

Logo, o gerenciamento adequado dos substratos é fundamental para aumentar a produção de biogás em comparação com a DA realizada com mono-substratos. Além disso, atenção vem sendo dada a potenciais pré-tratamentos das biomassas a ser digeridas, o tipo de digestor utilizado, bem como a aclimação de microrganismos que realizam o bioprocessos (HAGOS *et al.*, 2017; YUAN; ZHU, 2016). A Co-DA pode aumentar a produção de biogás de 25% a 400% em relação à mono-digestão dos mesmos substratos (CAVINATO *et al.*, 2010; SHAH *et al.*, 2015). No entanto, mais pesquisas sejam necessárias nesta área para uma melhor compreensão das proporções de mistura apropriadas, efeitos de interação e o impacto da Co-DA (PATINVOH *et al.*, 2017).

Além das principais vantagens do processo, que são a melhoria da produção de biogás e do rendimento de metano como potencial resultado do balanço nutricional, a Co-DA pode fornecer outros importantes benefícios, como a melhor estabilização do processo, a diluição de substâncias inibitórias, a redução dos teores de umidade necessários na alimentação do digestor, redução da emissão de gases de efeito estufa, aumento da carga de matéria orgânica biodegradável, assim como vantagens econômicas pelo fato de compartilhar o mesmo reator e custos de operação (ASTALS *et al.*, 2014; ASTALS *et al.*, 2011; CAVINATO *et al.*, 2010; HOLM-NIELSEN *et al.*, 2009; MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014; MATA-ALVAREZ; LLABRÉS, 2000; SHAH *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Estudos de co-digestão anaeróbia com diferentes resíduos orgânicos para a produção de metano.

Substrato	Co-substrato	Referência
Dejeto suíno	Resíduos alimentares (pré-tratados mecanicamente)	Izumi <i>et al.</i> (2010)
Cama de aviário	Resíduos agrícolas e alimentares	Zahan <i>et al.</i> (2018)
Dejeto suíno	Lodo de óleo de cozinha usado	Fierro <i>et al.</i> (2014a)
Borra da clarificação do caldo de cana	Vinhaça	González <i>et al.</i> (2017)
Lodo de esgoto	Resíduo alimentar + glicerol	Silva <i>et al.</i> (2018)
Dejeto suíno	Palha de milho + resíduo de pepino	Wang <i>et al.</i> (2018)
Resíduos de papel	Biomassa de macroalgas	Rodríguez <i>et al.</i> (2018)
Dejeto suíno	Glicerina	Astals <i>et al.</i> (2011)
Dejeto suíno	Cianobactérias de lago eutrofizado	Miao <i>et al.</i> (2014)
Cama de aviário	Penas de frango	Costa <i>et al.</i> (2012a)
Dejeto líquido bovino	Penas pré-tratadas	Mézes; Tamás (2015)
Resíduos sólidos urbanos	Penas (com ou sem pré-tratamento)	Forgács <i>et al.</i> (2013)

#### 2.2.4 Métodos de avaliação e modelos cinéticos do processo de DA

A mensuração do volume de metano produzido durante a DA pode ser realizada após a lavagem do biogás com solução alcalina, que objetiva a remoção do CO<sub>2</sub>. O volume de metano pode ser aferido diretamente ou então indiretamente pelo volume de solução alcalina deslocado pelo gás lavado (considerando a densidade da solução alcalina), representando técnicas de baixo custo e fácil implementação (AQUINO *et al.*, 2007).

Tais estratégias, com pequenas variações, são corriqueiramente empregadas em estudos de DA para estimar a produtividade de metano a partir de substratos de interesse, explorar e determinar as possibilidades de um material orgânico servir como substrato para a DA, avaliar a adequação e eficiência potencial do processo para uma dada combinação de substratos orgânicos (Co-DA), averiguar instabilidades e condições inibitórias/tóxicas nos reatores anaeróbios, e também no intuito de progredir

na modelagem do processo de produção de metano (HOLDER *et al.*, 2017; RAPOSO *et al.*, 2011; SHANMUGAM; HORAN, 2009; WANG *et al.*, 2014; WICKHAM *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2017).

#### 2.2.4.1 Estudos cinéticos

Estudos cinéticos de modelos de DA podem fornecer informações úteis para a análise, projeto e operação do bioprocessamento (MU *et al.*, 2006). Conforme Hagos *et al.* (2017), os modelos matemáticos tornaram-se importante prática no projeto de usinas de biogás, controle operacional, previsão e otimização dos processos.

No contexto da aplicação de modelos cinéticos em processos de DA, se distinguem basicamente duas abordagens: modelos estruturados e não estruturados. Os modelos estruturados levam em consideração a cinética de transformação envolvida em todo o processo de conversão de biomassa, incluindo transformações físicas, químicas e biológicas. Para o processo de DA, destaca-se o modelo ADM1 (BATSTONE *et al.*, 2002; IWA, 2002).

Outra abordagem diz respeito aos modelos não estruturados, nos quais a descrição da cinética do processo considera as velocidades de crescimento dos microrganismos, as velocidades de consumo de substratos e de formação de produtos, interpretando a população celular como soluto monocomponente ideal. Tal abordagem nos dá uma visão macroscópica do sistema – típico de aplicações da engenharia.

Por um lado, a abordagem adotada no Modelo de Digestão Anaeróbia nº. 1 (ADM1) fornece a descrição detalhada de diversas variáveis, incluindo a composição do sistema. Por outro lado, nos fornece um problema matemático de difícil resolução. Neste contexto, abordagens mais simples, mas menos detalhadas, vêm sendo amplamente utilizadas na literatura para descrição dos sistemas biológicos, as quais consideram uma etapa limitante do processo. No caso da DA, normalmente cita-se a metanogênese como etapa limitante (CHEN, 1983).

Em sistemas experimentais para DA, a quantidade de metano formada durante a conversão da matéria orgânica por microrganismos é a medida comumente utilizada como variável de resposta, que reflete simultaneamente a atividade microbiana e o grau de biodegradação, pois considera-se que a produção de biogás é diretamente proporcional à degradação do substrato (YANG *et al.*, 2016).

Em sistemas em batelada, como resultado da modelagem das taxas de transformação, diversos modelos analíticos podem ser obtidos. A equação de Gompertz modificada (GOMPertz, 1825; ZWIETERING *et al.*, 1990), tipicamente aplicada à degradação de substratos orgânicos simples, é um dos modelos que mais se ajustam aos resultados experimentais de cinética de produção de metano (WARE; POWER, 2017b). Conforme (ZWIETERING *et al.*, 1990) a equação de Gompertz modificado, assim como o modelo Logístico, utilizam três parâmetros: produtividade máxima de metano; velocidade máxima de crescimento celular; e tempo de fase lag. As equações de Richards (RICHARDS, 1959) e de Stannards (STANNARD *et al.*, 1985) são modelos equivalentes e fazem uso de parâmetros semelhantes às equações de Gompertz e Logística, porém considera um quarto parâmetro que é o fator de forma da curva. Outro modelo descrito é a equação de Schnute (SCHNUTE, 1981), descrita como uma equação base a partir da qual podem ser obtidos os demais modelos relatados anteriormente.

A Figura 2 apresenta exemplos de curvas típicas de produção cumulativa de metano. A degradação de substratos simples normalmente apresenta curvas de produção de metano em forma de L invertido. Para substratos mais complexos, os padrões de degradação observados podem apresentar formatos diferenciados. Por outro lado, a degradação mais lenta de substratos, bem como sistemas com inibição do crescimento celular, resultam em curvas sigmoidais ou curvas em degraus (WARE; POWER, 2017).

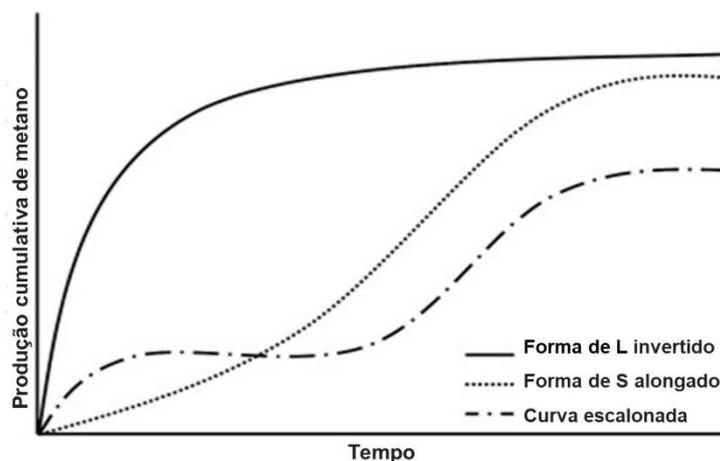


Figura 2 - Curvas típicas de produção cumulativa de metano. Adaptada de Ware; Power (2017).

Conforme Zwietering *et al.* (1990) e Ware; Power (2017) não existe um padrão único para a modelagem cinética da produção cumulativa de metano para diferentes substratos. Assim, com base em dados experimentais de um processo de crescimento ou de produção de metano, diferentes modelos devem ser aplicados para determinação da melhor descrição. Neste contexto, a Tabela 3 apresenta alguns trabalhos nos quais foram utilizados os modelos relatados, bem como diferentes substratos utilizados para DA.

Tabela 3 - Modelos cinéticos aplicados a experimentos de DA em batelada.

Modelo	Substrato usado	Referência
Primeira Ordem e Gompertz modificado	Co-digestão de dejetos suíno e resíduos de maçã	Kafle; Kim (2013)
Richards modificado, Logistic modificado e Gompertz modificado	Dejetos de matadouro de aves	Ware; Power (2017)
Primeira Ordem e Gompertz modificado	Resíduos de peixe	Kafle <i>et al.</i> (2013)
Primeira Ordem	Adbos de origem animal, palhas de colheita, alimentos e resíduos verdes, processamento de resíduos orgânicos, grama energética e outras biomassas lignocelulósicas	Li <i>et al.</i> (2013)
Gompertz	Resíduos alimentares	Hobbs <i>et al.</i> , (2018)
Primeira Ordem e Gompertz modificado	Co-digestão de dejetos suíno e lodo de esgoto desidratado	Zhang <i>et al.</i> (2014)
Primeira Ordem e Primeira ordem sobreposto	Dejetos suíno (DA sólida)	Wu <i>et al.</i> (2017)
Primeira ordem, Primeira ordem pseudo-paralelo, Gompertz modificado e Modelos de função de transferência.	Algas-bacterianas e celulose	Bohutskyi <i>et al.</i> (2018)

### **3 RESULTADOS**

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma artigo científico, como previsto pelo Ato Deliberativo Nº 01/PPGATS/UFS/2017.

### 3.1 PRODUÇÃO DE METANO ATRAVÉS DA CO-DIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETO DE SUÍNOS E PENAS DE FRANGO SUBMETIDAS A PRÉ-TRATAMENTO

Vera Analise Schommer<sup>1</sup>, Bruno München Wenzel<sup>1</sup>, Daniel Joner Daroit<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologia Sustentáveis, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, RS.

#### 3.2 RESUMO

Diferentes substratos vêm sendo investigados quanto ao rendimento de metano durante a digestão anaeróbia (DA) e Co-DA. Dejetos de suínos e penas de frango são abundantes resíduos da cadeia produtiva da carne. Embora dejetos sejam empregados na DA, a recalcitrância das penas pode afetar o processo. Pré-tratamentos podem otimizar a aplicação de biomassas na Co-DA. Objetivou-se avaliar a produção de metano de dejetos de suínos fresco (DF) ou maturado (DM) adicionados de penas (submetidas ou não a pré-tratamento microbiano). DF (diluído 1:2) e DM (diluído 1:1) foram utilizados como inóculo/substrato principal em dois experimentos (Exp), 1 e 2, respectivamente. Os co-substratos testados foram penas fragmentadas (PF) e hidrolisado de penas produzido por bactéria queratinolítica (HP); DF esterilizado foi utilizado nos controles (C) para ajuste da concentração inicial de sólidos totais (ST). No Exp DF, concentrações de 5,67% (1X) e 6,80% ST (2X) foram avaliadas; os co-substratos representaram 28,5% e 40,4% dos ST, respectivamente. No Exp DM, concentrações de 4,6% (1X) e 5,1% ST (2X) foram investigadas; os co-substratos representaram 12,1% e 20,6% dos ST. As Co-DA ocorreram a 35 °C por 82-83 dias. A produção de metano foi mensurada por deslocamento de solução alcalina. Parâmetros físico-químicos foram avaliados para inóculos, co-substratos e produtos finais. No Exp DF (inóculo DF), a produção final de metano não foi afetada pelos co-substratos 1X (0,48 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>). Considerando a concentração 2X, o HP reduziu em 43% (0,28 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>) a produção de metano em relação a PF e C, possivelmente pelos elevados níveis de nitrogênio amoniacal. A PF (1X e 2X) não afetou o rendimento final de metano, embora tenham resultado em diminuição transitória deste parâmetro. No Exp DM (inóculo DM), a produção de metano foi superior para o HP (1X e 2X; 0,16 e 0,19 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>, respectivamente). Contudo, PF (1X e 2X) resultaram em menores produções de metano (0,12 e 0,16 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup>), sugerindo diminuída biodegradabilidade. O modelo de Gompertz modificado demonstrou o melhor ajuste à cinética da produção de metano nos experimentos em relação a outros três modelos testados. Em suma, há a possibilidade de usar PF em processos de Co-DA com DF/DM. A concentração de HP e o inóculo demonstraram ser fatores importantes para a produção de metano, tanto pela inibição da Co-DA observada com DF, quanto pelo efeito positivo no rendimento de metano usando DM. O pré-tratamento microbiano das penas representa estratégia para acelerar e aumentar a produção de metano.

**3.3 PALAVRAS-CHAVE:** Biodigestão anaeróbia. Resíduos agroindustriais. Pré-tratamento microbiano. Hidrolisado de penas. Modelagem cinética.

### 3.4 INTRODUÇÃO

Atividades pecuárias e as indústrias relacionadas geram enormes quantidades de efluentes e resíduos que necessitam de destinação adequada devido aos seus potenciais poluidores (KHALID *et al.*, 2011). Uma das tecnologias para o tratamento de resíduos orgânicos é a digestão anaeróbia (DA). A DA consiste em múltiplas etapas, especificamente a hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, nas quais substratos orgânicos são degradados biologicamente por microrganismos atuando de forma sinérgica em ambiente anaeróbio. Neste processo, um dos produtos finais é uma mistura de gases, composta majoritariamente por metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), denominada biogás (BATSTONE; VIRDIS, 2014). Logo, a DA representa interessante estratégia em comparação a outras empregadas para o manejo de resíduos, pois combina o tratamento de resíduos à produção de energia (CH<sub>4</sub>) e à obtenção de um subproduto que, por seu valor nutricional, pode ser usado como fertilizante agrícola (COSTA *et al.*, 2012a).

Dejetos bovinos (NIELSEN; ANGELIDAKI, 2008), dejetos de suínos (BARRET *et al.*, 2013) e cama de aviário (COSTA *et al.*, 2012b) são amplamente investigados em processos de DA. Particularmente, os dejetos de suínos possuem alta quantidade de água, capacidade tamponante e nutrientes, bem como elevada carga microbiana, que os caracterizam como favoráveis ao crescimento microbiano e ao processo de DA (CÓRDOBA *et al.*, 2016). Uma alternativa que vem recebendo crescente atenção é a co-digestão (Co-DA) de diferentes resíduos orgânicos, visando otimizar o equilíbrio de nutrientes e a sinergia microbiana, superando potenciais déficits da DA realizada com substrato único (JIMÉNEZ *et al.*, 2015) e, conseqüentemente, aumentando o rendimento de metano (PATINVOH *et al.*, 2017). Ainda, a coexistência de diferentes tipos de resíduos orgânicos na mesma área geográfica pode permitir uma gestão integrada, oferecendo benefícios ambientais consideráveis (HAGOS *et al.*, 2017).

No entanto, diferentes materiais orgânicos podem não ser adequados para a DA e/ou Co-DA, devido particularmente à dificuldade de degradação pelos microrganismos, mas também à presença de inibidores no substrato, e mesmo a produção de compostos inibitórios durante o processo anaeróbio (PATINVOH *et al.*, 2017), resultando em baixos rendimentos de CH<sub>4</sub> e, com isso, longos tempos de retenção (BOE; ANGELIDAKI, 2009). Neste sentido, tecnologias de pré-tratamento de biomassas, que empregam diversos métodos físicos, químicos e biológicos, vêm

sendo avaliadas especialmente para facilitar o processo de hidrólise, tornando o conteúdo orgânico dos substratos mais acessível e utilizável pela microbiota nos digestores anaeróbios, no intuito de incrementar e/ou acelerar a produção de metano (CARLSSON *et al.*, 2012; MEEGODA *et al.*, 2018).

Penas de frango estão entre os principais resíduos sólidos produzidos pela indústria avícola durante o processamento das aves para obtenção de carne. As penas representam 5 a 10 % do peso corporal de frangos de corte (SALMINEN; RINTALA, 2002), compostas basicamente (85-90%, base seca) por queratinas, proteínas fibrosas, estáveis e insolúveis que conferem às penas elevada recalcitrância ambiental (BRANDELLI *et al.*, 2015). Embora a DA represente potencial estratégia de manejo, considerando o rendimento teórico de metano a partir da composição das penas, sua reduzida biodegradabilidade é fator a ser considerado (COSTA *et al.*, 2012a). Investigações acerca da utilização de penas de frango em processos de DA e Co-DA são relativamente escassas e resultados discrepantes vêm sendo reportados quanto ao efeito das penas e de seu pré-tratamento sobre o rendimento de metano (COSTA *et al.*, 2012a; FORGÁCS *et al.*, 2013; MÉZES; TAMÁS, 2015; PATINVOH *et al.*, 2018; SALMINEN *et al.*, 2003; XIA *et al.*, 2012a). Neste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar parâmetros físico-químicos e a cinética de produção de metano em processos de Co-DA utilizando dejetos de suínos como inóculo/substrato principal e, como co-substratos, penas de frango ou penas submetidas a pré-tratamento microbiano com bactéria queratinolítica.

## 3.5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia, Reatores e Operações Unitárias, e Climatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Cerro Largo*. Os experimentos e análises foram realizados, pelo menos, em triplicatas.

### 3.5.1 Inóculos, substratos e co-substratos

#### 3.5.1.1 Inóculos/substratos

O dejetos suíno usado como inóculo/substrato para a DA foi coletado em uma granja de suínos (estágio de terminação/engorda), situada na zona rural do município de Cerro Largo/RS. Devido ao dejetos coletado ser concentrado, o mesmo foi diluído para possuir quantidade de sólidos totais (ST) condizente com processo de DA em estado líquido (LIOTTA *et al.*, 2014).

O dejetos fresco (DF) foi diluído (1:2) em água destilada e utilizado como inóculo e substrato principal para a realização do Experimento DF (Exp DF). Para simular a principal estratégia de manejo de dejetos usada no Brasil, ou seja, o armazenamento temporário em lagoas, parte do dejetos coletado permaneceu em condições estáticas por 90 dias, sob temperatura ambiente e em local coberto, para maturação. O dejetos maturado (DM) foi diluído (1:1) em água destilada para atingir concentração de sólidos totais (ST) iniciais similares ao DF (1:2), cerca de 4,05 % ST, sendo então utilizado como inóculo para a realização do Experimento DM (Exp DM). DF e DM, já diluídos, foram caracterizados quanto a diversos parâmetros físico-químicos, apresentados em seções posteriores.

#### 3.5.1.2 Co-substratos

##### 3.5.1.2.1 Controle (C)

O co-substrato denominado controle (C), usado nos experimentos de Co-DA, foi produzido a partir do dejetos fresco de suínos não diluído. Amostra do dejetos de suínos foi esterilizada em autoclave (Modelo AV-75, Phoenix Lufenco, Brasil) a 121 °C,

1 atm, por 30 min, visando eliminar os microrganismos presentes para que estes não contribuíssem na DA. Posteriormente, o material foi submetido a secagem em estufa (Luca 80, Lucadema, Brasil) a 105 °C até atingir peso constante. O produto foi então moído em um moinho analítico (A 11 Basic, IKA, China), peneirado (partículas < 600 µm), e então armazenado até seu uso. Este co-substrato foi empregado buscando ajustar a quantidade de ST iniciais entre os reatores controle (C) e os reatores que receberam diferentes co-substratos.

#### 3.5.1.2.2 *Penas fragmentadas (PF)*

As penas utilizadas em todos os experimentos foram obtidas de um aviário de frangos de corte, na zona rural do município de Santo Cristo/RS. As penas foram previamente classificadas, lavadas com detergente neutro e água corrente, e então enxaguadas com água destilada e submetidas a secagem anteriormente ao uso.

Estas penas foram processadas mecanicamente (fragmentos < 5 mm), visando o aumento da área superficial das penas a ser utilizadas em experimentos de Co-DA.

#### 3.5.1.2.3 *Hidrolisado de penas (HP)*

As penas pré-tratadas biologicamente, denominadas HP, foram hidrolisadas através de cultivos submersos com a bactéria *Bacillus* sp. CL18 conforme descrito por Callegaro *et al.* (2018). O isolado bacteriano foi cultivado em meio mineral contendo penas de frango (30 g L<sup>-1</sup>), a 30 °C, 125 rpm, por 7 dias. Após os cultivos, os meios foram autoclavados (121 °C, 15 min) e submetidos a secagem até massa constante. Posteriormente, o material seco foi triturado e peneirado (partículas < 600 µm).

### 3.5.2 **Digestão anaeróbia para a produção de metano**

Para os experimentos (Exp) de DA e produção de metano, estabeleceu-se que o volume de DF (1:2) ou DM (1:1) seria o mesmo (200 mL) em todos os reatores anaeróbios, representados por frascos de Erlenmeyer de 500 mL. Os processos de DA foram realizados utilizando reatores em triplicata para cada condição especificada abaixo.

### 3.5.2.1 Experimento DF

No Exp DF utilizou-se DF (~ 4,05 % ST) como inóculo/substrato principal. Aos reatores foram adicionadas massas de co-substratos (C, HP ou PF) para atingir 5,67 % ST (reatores 1X) ou 6,80 % ST (reatores 2X). Deste modo, dos ST presentes nestes reatores, 28,5 % (1X) e 40,4 % (2X) corresponderam à adição dos co-substratos (Tabela 4).

### 3.5.2.2 Experimento DM

No Exp DM utilizou-se DM como inóculo (~ 4,05 % ST). Foram adicionadas massas de co-substratos (C, HP e PF) aos reatores para obter 4,6 % ST (reatores 1X) ou 5,1 % ST (reatores 2X). Assim, dos ST presentes nestes reatores, 12,1 % (1X) e 20,6 % (2X) corresponderam à adição dos co-substratos (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição dos reatores, com base nos ST de inóculos/substratos e co-substratos.

Composição dos reatores	Exp DF		Exp DM	
	1X	2X	1X	2X
ST do Inóculo/substrato (%)	4,05	4,05	4,05	4,05
ST do Co-substrato (%)	1,62	2,75	0,55	1,10
ST nos reatores (%)	5,67	6,80	4,60	5,10
Contribuição dos ST <sub>Co-substrato</sub> nos reatores (% ST)	28,50	40,40	12,10	20,60

### 3.5.2.3 Condições operacionais de DA e determinação de metano

O aparato experimental utilizado para o Exp DF e Exp DM foi montado de forma similar ao descrito por Chernicharo (2007) para aferição do volume de CH<sub>4</sub> produzido.

Os reatores anaeróbios (Erlenmeyers) contendo inóculo e co-substratos foram alocados em uma estufa bacteriológica (AL 101/150, AmericanLab, Brasil) a 35 °C. Os reatores foram fechados com rolhas de borracha e fita politetrafluoretileno. Em cada rolha, uma agulha hipodérmica permitia a saída do biogás do reator. Após a

agulha, instalou-se uma válvula que auxiliava na manutenção da pressão e concentração de biogás no interior do reator. Esta válvula estava conectada a uma mangueira de poliuretano que conduzia o biogás produzido no reator para o exterior da estufa até frascos invertidos contendo solução alcalina ( $2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ ), para o borbulhamento e lavagem do biogás (absorção de  $\text{CO}_2$ ), sendo o metano ( $\text{CH}_4$ ) mantido na parte superior do frasco. O aumento do volume de metano retido resulta na expulsão da solução de  $\text{NaOH}$ , que era coletada em frascos Erlenmeyers para determinação do volume de metano produzido (SHANMUGAM; HORAN, 2009). Foram desconsiderados traços de outros gases presentes com o metano produzido.

Métodos similares de mensuração do volume de metano produzido em processos de DA, baseados na absorção de  $\text{CO}_2$  por soluções alcalinas, são descritos na literatura (WANG *et al.*, 2014; WICKHAM *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2017). A Fig. S1 (material suplementar) ilustra o sistema montado para a realização dos experimentos.

Os frascos que recebiam a solução alcalina deslocada tinham sua massa mensurada periodicamente para aferir o volume de metano produzido por cada reator (GUWY, 2004), aplicando a Equação (1):

$$V_{\text{CH}_4} \text{ (mL)} = \frac{\text{massa frasco cheio} - \text{massa frasco vazio}}{\text{densidade da solução de NaOH}} \quad (1)$$

As mensurações de massa foram realizadas a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  em condição de pressão similar à atmosférica. A cada aferimento da solução deslocada os reatores eram agitados manualmente para a homogeneização de seu conteúdo. Considerando a redução da taxa de produção de metano em ambos os experimentos, o período da DA foi de 82 dias no Exp DF e 83 dias no Exp DM. Os resultados da produção acumulada de  $\text{CH}_4$  ( $\text{L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ ) foram comparados após análise estatística de significância dos valores médios usando análise de variância de fator único (ANOVA). Significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

### 3.5.3 Parâmetros físico-químicos

Os inóculos/substratos e co-substratos foram avaliados quanto a sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total de Kjeldahl (TKN) e nitrogênio amoniacal total (TAN) utilizando métodos padrão (APHA,

2005). Ao final do Exp DF e Exp DM os conteúdos dos reatores foram avaliados quanto a ST, SV, DQO e TAN. Ainda, o pH foi mensurado nos inóculos/substratos e no conteúdo final dos reatores.

### 3.5.4 Modelos matemáticos para a produção acumulada de metano

Com base nos resultados experimentais de produção acumulada de metano ( $\text{L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ ) em diferentes condições, importantes informações podem ser obtidas com base no ajuste de modelos matemáticos para a cinética do processo. Neste trabalho foram utilizados modelos amplamente empregados na literatura: logístico, Gompertz (GOMPERTZ, 1825), Richards (RICHARDS, 1959) / Stannard (STANNARD; WILLIAMS; GIBBS, 1985) e Schnute (SCHNUTE, 1981).

A Tabela 5 apresenta a forma funcional destes modelos (Equações (2) a (5)). Foram empregadas as versões dos modelos modificadas por Zwietering et al. (1990), as quais apresentam parâmetros de significado biológico, como (i) taxa máxima de produção de metano,  $\mu_m$ ; (ii) produção máxima de metano, A; (iii) tempo de fase Lag,  $\lambda$ ; e (iv) fator de forma da curva,  $\nu$ .

Os dados obtidos em cada corrida experimental foram utilizados para o ajuste dos modelos matemáticos de produção acumulada de metano apresentados na Tabela 5. Os parâmetros de cada modelo foram obtidos utilizando o algoritmo de otimização *trust-region-reflective*, descrito por Coleman; Li (1996), de forma a minimizar a função objetivo dos mínimos quadrados. A programação e algoritmos relatados neste trabalho empregaram o software Matlab R2015a.

Tabela 5 - Modelos de produção acumulada de metano utilizados no trabalho.

Identificação	Modelo	Parâmetros	Equação
Logístico modificado	$V_{CH_4} = \frac{A}{1 + \exp\left[\frac{4\mu_m}{A}(\lambda - t) + 2\right]}$	$A, \mu_m, \lambda$	(2)
Gompertz modificado	$V_{CH_4} = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$	$A, \mu_m, \lambda$	(3)
Richards / Stannard modificado	$V_{CH_4} = A \left\{1 + \nu \exp(1 + \nu) \exp\left[\frac{\mu_m}{A}(1 + \nu) \left(1 + \frac{1}{\nu}\right)(\lambda - t)\right]\right\}^{-\frac{1}{\nu}}$	$A, \mu_m, \lambda, \nu$	(4)
Schnute modificado	$V_{CH_4} = \left(\mu_m \frac{1 - b}{a}\right) \left\{\frac{1 - b \exp[a(\lambda - t) + 1 - b]}{1 - b}\right\}^{\frac{1}{b}}$	$a, b, \mu_m, \lambda$	(5)

O procedimento para seleção do modelo matemático consistiu em: (i) ajuste/obtenção dos valores dos parâmetros de cada modelo matemático testado, para cada conjunto de dados experimentais; (ii) cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ); (iii) cálculo do critério de informação de Akaike corrigido (AICc), conforme Equação (6), para comparação dos modelos com diferentes número de parâmetros. O AICc consiste em uma correção do critério de informação de Akaike (AIC) para amostras pequenas ( $n/np < 40$ ) (HURVICH; TSAI, 1991). Onde:  $n$  é o número de observações experimentais ajustadas com o modelo;  $np$  é o número de parâmetros do modelo; os sub-índices “exp” e “mod” denotam os dados experimentais e preditos pelo modelo, respectivamente.

$$AICc = n \ln \left\{ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[ (V_{CH_4})_{exp}^i - (V_{CH_4})_{mod}^i \right]^2 \right\} + 2(np + 1) \left( 1 + \frac{np + 2}{n - np - 2} \right) \quad (6)$$

A seleção do melhor modelo matemático consistiu no ranqueamento dos mesmos com base no menor valor de AICc. O AICc vem sendo amplamente utilizado na literatura (MONTE BLANCO *et al.*, 2017), já que permite a avaliação da acurácia, bem como da precisão e habilidade de diferentes modelos para descrição dos dados experimentais, levando em conta, inclusive, o número de parâmetros necessários (AKAIKE, 1973).

## 3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.6.1 Caracterização dos inóculos/substratos e co-substratos

As características dos inóculos/substratos principais e co-substratos usados na Co-DA são apresentados na Tabela 6. Estes dados foram utilizados para a montagem dos experimentos de DA e obtenção dos parâmetros de cada reator no início dos experimentos.

O inóculo/substrato DF (Exp DF), já diluído em água destilada (1:2), apresentou valores médios de ST, SV e DQO de 40,65 g L<sup>-1</sup>, 28,6 g L<sup>-1</sup>, 81,61 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Como o objetivo deste estudo foi utilizar reatores de DA com mesma quantidade de sólidos totais iniciais, os resultados de ST para o inóculo DM (diluído 1:1) foram similares ao DF (diluído 1:2). Os valores de SV e DQO para o DM foram de 22,32 g SV L<sup>-1</sup> e 110,50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O TKN e TAN foram de 2.030,00 mg L<sup>-1</sup> e 723,33 mg L<sup>-1</sup> no DF. Embora valores similares de TKN tenham sido detectados para o DM, praticamente o dobro de TAN foi mensurado no DM (Tabela 6). O pH mensurado para DF foi 7,46, já o pH do DM apresentou-se mais alcalino (8,90).

As fontes de inóculo para DA são heterogêneas, variando também em aspectos como a concentração, atividade e aclimação da microbiota, entre outros (RAPOSO *et al.*, 2011). No entanto, alguns parâmetros podem ser comparados com inóculos utilizados em outros estudos. Valores similares de ST e SV foram encontrados por Xia *et al.*, (2015, 2012b) para dejetos de suínos, lodo de esgoto e dejetos de gado leiteiro maturados, usados como inóculos em experimentos de Co-DA. O pH destes inóculos (7,50-8,08) foi similar ao DF; contudo, os valores de TKN (4,48-6,70 g L<sup>-1</sup>) e TAN (3,09-5,58 g L<sup>-1</sup>) apresentaram-se superiores em relação a DF e DM (Tabela 6). A DQO em dejetos de suínos fresco (inóculo/substrato) e digerido (inóculo), utilizados por Córdoba *et al.* (2016) em experimentos de DA foi inferior aos observados (Tabela 6); contudo, os valores de TAN apresentados por aqueles autores foram similares aos observados em DF e DM, enquanto que Xia *et al.*, (2012a) indicaram valores superiores para dejetos suínos maturados.

Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos dos inóculos/substratos e co-substratos utilizados no processo de digestão anaeróbia.

<i>Inóculo/ Substrato</i>	ST	SV	DQO	pH	TKN	TAN
DF (1:2)	40,65 ± 1,05 g L <sup>-1</sup>	28,60 ± 0,58 g L <sup>-1</sup>	81,61 ± 3,47 g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	7,46 ± 0,01	2030,00 ± 140,00 mg L <sup>-1</sup>	723,33 ± 213,85 mg L <sup>-1</sup>
DM (1:1)	40,48 ± 2,01 g L <sup>-1</sup>	22,32 ± 0,73 g L <sup>-1</sup>	110,50 ± 8,33 g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	8,90 ± 0,01	1890,00 ± 140,00 mg L <sup>-1</sup>	1353,33 ± 213,85 mg L <sup>-1</sup>
<i>Co-substrato</i>						
C	0,97 ± 0,04 g g <sup>-1</sup>	0,69 ± 0,02 g (g ST) <sup>-1</sup>	1,15 ± 0,03 g O <sub>2</sub> (g ST) <sup>-1</sup>	-	40,20 ± 1,20 mg (g ST) <sup>-1</sup>	7,41 ± 0,33 mg (g ST) <sup>-1</sup>
HP	0,96 ± 0,05 g g <sup>-1</sup>	0,93 ± 0,06 g (g ST) <sup>-1</sup>	1,17 ± 0,11 g O <sub>2</sub> (g ST) <sup>-1</sup>	-	172,29 ± 34,05 mg (g ST) <sup>-1</sup>	25,47 ± 3,57 mg (g ST) <sup>-1</sup>
PF	0,89 ± 0,00 g g <sup>-1</sup>	0,78 ± 0,05 g (g ST) <sup>-1</sup>	1,33 ± 0,05 g O <sub>2</sub> (g ST) <sup>-1</sup>	-	170,79 ± 11,71 mg (g ST) <sup>-1</sup>	13,61 ± 1,37 mg (g ST) <sup>-1</sup>

ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; DQO: demanda química de oxigênio; TKN: nitrogênio total de Kjeldahl; TAN: nitrogênio amoniacal total.

Para o co-substrato PF, os resultados de SV foram inferiores aos reportados para as penas (97-99%) utilizadas em processos de Co-DA (COSTA *et al.*, 2012a; PATINVOH *et al.*, 2016). Contudo, a DQO das PF (Tabela 6) foi similar ao reportado (1,41 g DQO (g ST)<sup>-1</sup>) por Costa *et al.*, (2012b) e superior ao indicado (1,20 g DQO (g ST)<sup>-1</sup>) por Xia *et al.*, (2012b). Resultados comparáveis de TKN de penas (137-148 mg N (g ST)<sup>-1</sup>) foram apresentados por Patinvoh *et al.*, (2016) e Xia; *et al.*, (2012a). A relação DQO:N das PF (7,8:1) foi inferior (10-11:1) à obtida por Costa *et al.*, (2012b).

A análise da literatura indica a escassez de dados acerca da caracterização físico-química de hidrolisados de pena utilizados em DA, embora estes parâmetros possam influenciar na produção de metano. O HP obtido apresentou resultados similares às PF para parâmetros como SV, DQO e TKN (Tabela 6). Contudo, valores de TAN foram superiores no HP, corroborando a ocorrência de desaminação de aminoácidos e peptídeos durante a degradação de penas por *Bacillus* sp. CL18, ou seja, a mineralização do N orgânico (CALLEGARO *et al.*, 2018).

O co-substrato C (dejeito fresco esterilizado e desidratado) apresentou menor concentração de SV, TKN e TAN quando comparado ao HP e às PF (Tabela 6). Os maiores valores de TKN e TAN nos co-substratos HP e PF eram esperados, uma vez que as penas são compostas majoritariamente por proteínas (~90%, m m<sup>-1</sup>) (BRANDELLI *et al.*, 2010).

### 3.6.2 Caracterização físico-química (t<sub>0</sub> e t<sub>f</sub>) nos experimentos de Co-DA

Os dados apresentados na seção anterior foram utilizados para a caracterização das condições iniciais dos reatores no início (t<sub>0</sub>) dos Exp DF e Exp DM, considerados como DA em estado líquido, ou seja, com concentração de ST inferior a 10 % (LIOTTA *et al.*, 2014). Ao final dos processos de DA (t<sub>f</sub>), os parâmetros ST, SV, DQO, TAN e pH foram avaliados para o conteúdo remanescente nos biodigestores. Em ambos os experimentos (Exp DF e Exp DM), nas duas concentrações de co-substratos adicionadas (1X e 2X), é possível notar a contribuição do HP e da PF na elevação dos teores iniciais (t<sub>0</sub>) de TAN (Tabelas 7 e 8).

Considerando o Exp DF, nos reatores 1X (56,7 g ST L<sup>-1</sup>) observou-se redução de 65,1, 47,4 e 54,2 % nos SV nas condições C1X, HP1X e PF1X, respectivamente, enquanto que as reduções na DQO representaram 35,7, 47,0 e 71,2 % em relação ao t<sub>f</sub> (Tabela 7). Nos reatores 2X (67,5 g ST L<sup>-1</sup>), os percentuais de redução de SV nos

reatores C2X, HP2X e PF2X foram de 62,1, 54,2 e 64,4 % (Tabela 7). Reduções de DQO da ordem de 36,5, 31,3 e 37,8 %, foram observadas nos reatores C2X, HP2X e PF2X, respectivamente.

Independentemente do co-substrato (C, HP, PF) e de sua concentração (1X e 2X), o TAN foi incrementado no  $t_f$  em todas as condições do Exp DF. Nos reatores 1X, concentrações finais de TAN foram de 1.516-1.726 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que nos reatores 2X as maiores concentrações de TAN foram observadas em HP2X e PF2X (Tabela 7). Os resultados de TAN ( $t_0$  e  $t_f$ ) indicam a mineralização de parcela do N orgânico presente nos reatores (CHEN *et al.*, 2014). Especificamente nos reatores 2X, a diferença entre  $t_0$  e  $t_f$  indica a contribuição do HP e da PF para o maior incremento proporcional do TAN.

A maioria dos processos de DA é iniciada com pH inicial de 7,0-7,8 (RAPOSO *et al.*, 2011), considerando o pH ótimo de atuação dos microrganismos responsáveis pelas diferentes etapas da DA (APPELS *et al.*, 2008). Não houve variações consideráveis do pH no  $t_f$  em relação ao pH no  $t_0$  (7,4) quando avaliados os reatores 1X e 2X do Exp DF; no entanto, tendência de valores superiores de pH (7,9) foram observados nos reatores contendo HP e PF como co-substratos (Tabela 7).

De forma similar, na DA de penas inteiras (com ou sem a adição de bactéria queratinolítica aos biodigestores) utilizando diferentes inóculos, o pH inicial ajustado de 7,0-7,2 foi incrementado para 7,5-7,9 ao final dos bioprocessos (COSTA *et al.*, 2012b). Aumento do pH também foi descrito ao final da Co-DA de outros resíduos queratinosos (XIA *et al.*, 2015). Forgács *et al.*, (2013) reportaram, para a Co-DA de penas moídas (com ou sem adição de enzima proteolítica aos reatores) e resíduos orgânicos (1:4) em condições termofílicas, pH inicial de 7,8. Ao final da Co-DA, o pH não foi alterado nos reatores com adição de enzima, mas o pH foi elevado para 8,1 naqueles sem adição de enzima.

Referente ao Exp DM (Tabela 8), em que foi utilizado como inóculo o dejetos suíno maturado (DM), os reatores 1X (51,1 g ST L<sup>-1</sup>) apresentaram 13,0, 17,7 e 22,0% de redução dos SV em C1X, HP1X e PF1X, respectivamente, enquanto que para a DQO, as reduções foram de 17,0, 29,4 e 45,8 %. Na condição 2X (56,7 g ST L<sup>-1</sup>), a redução de SV foi de 22,4, 28,5 e 29,5 % para os reatores C2X, HP2X e PF2X, respectivamente; quanto à DQO reduções de 27,4, 40,1 e 36,7 %, respectivamente, foram observadas.

Tabela 7 - Parâmetros físico-químicos no início (t<sub>0</sub>) e ao final (t<sub>f</sub>) do processo de DA nos reatores do Exp DF.

Reator	ST (g L <sup>-1</sup> )		SV (g L <sup>-1</sup> )		DQO (g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )		TAN (mg L <sup>-1</sup> )		pH	
	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>
C 1X	56,4	22,8 ± 4,5	36,2	12,6 ± 2,4	94,5	60,8 ± 10,6	626,1	1726,7 ± 132,0	7,5	7,4 ± 0,01
HP 1X	56,7	32,3 ± 4,2	39,1	20,5 ± 4,8	95,3	50,5 ± 11,7	840,8	1516,7 ± 213,9	7,5	7,9 ± 0,03
PF 1X	56,5	28,9 ± 2,4	38,4	17,6 ± 2,1	98,1	28,3 ± 10,1	711,4	1578,9 ± 310,7	7,5	7,7 ± 0,03
C 2X	67,3	29,9 ± 4,5	43,8	16,6 ± 2,5	107,5	68,3 ± 9,4	709,9	1236,7 ± 231,0	7,5	7,4 ± 0,02
HP 2X	68,0	34,9 ± 5,0	49,6	22,7 ± 4,0	109,1	74,9 ± 13,1	1138,9	2730,0 ± 80,8	7,5	7,9 ± 0,18
PF 2X	67,7	27,5 ± 1,4	48,1	17,2 ± 1,6	114,6	71,2 ± 21,0	880,3	2216,7 ± 46,7	7,5	7,8 ± 0,01

ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; DQO: demanda química de oxigênio; TAN: nitrogênio amoniacal. t<sub>0</sub> = tempo inicial; t<sub>f</sub> = tempo final (82 dias).

Córdoba *et al.*, (2016) observaram 32,01 % na remoção de SV e 18,41 % de remoção de DQO após a DA de dejetos suíno fresco, resultados inferiores aos obtidos no Exp DF (Tabela 7). Contudo, as remoções de SV e DQO na Co-DA de dejetos suíno fresco inoculado com dejetos de suínos maturados foram de 43 % e 53 %, respectivamente (CÓRDOBA *et al.*, 2016). Valores superiores de remoção de SV e DQO, em relação aos resultados do Exp DF (Tabela 7) e Exp DM (Tabela 8) foram descritos para processos de Co-DA de diversos outros materiais orgânicos, como resíduos alimentares e rejeitos da indústria de papel, utilizando lodo de esgoto digerido como fonte de inóculo (WICKHAM *et al.*, 2016). A remoção de SV e DQO está relacionada à produção de metano (CÓRDOBA *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2012b) e, neste sentido, a eficiência da remoção de SV e DQO é afetada por diversos fatores, como o inóculo, o material orgânico a ser (co-)digerido, dentre outras condições dos bioprocessos (COSTA *et al.*, 2012a; LOHANI; HAVUKAINEN, 2018; XIE *et al.*, 2017).

O comportamento do TAN no Exp DM (Tabela 8) foi distinto daquele observado para o Exp DF (Tabela 7). A concentração de TAN no  $t_f$  dos reatores C1X e C2X foi menor do que a mensurada em  $t_0$ ; já nos reatores HP e PF, concentrações relativamente estáveis de TAN foram avaliadas no início e ao fim da DA. O pH inicial mensurado para o conteúdo dos reatores foi de 8,9, idêntico ao pH do DM. Embora este pH inicial alcalino não tenha sido ajustado para o início da Co-DA, queda no pH de todos os reatores do Exp DM foi observada (7,4-7,9) ao final da biodigestão (Tabela 8). A queda e/ou manutenção do TAN nos digestores do Exp DM pode ser contextualizada em termos do pH relativamente alcalino (8,9) em  $t_0$ , que pode ter facilitado a volatilização de parte do TAN, na forma de amônia, no início da Co-DA (HAFNER; BISOGNI, 2009).

O subsequente decaimento do pH pode ser devido à rápida produção de ácidos voláteis nas etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese da DA a partir de compostos orgânicos facilmente biodegradáveis (MOUKAZIS *et al.*, 2018). Dai *et al.*, (2016) reportaram que durante a Co-DA de lodo de esgoto e azevém perene, o pH inicial de 12,0 (ajustado) decresceu rapidamente (pH 6,5 após 12 dias) devido aos processos de hidrólise e acidogênese, tendo depois se estabilizado em pH 7,2 até o final da DA (30 dias) (DAI *et al.*, 2016). Neste contexto, a chegada e manutenção do pH do meio em valores próximos à neutralidade dependem da capacidade tamponante dos materiais empregados na DA (RAPOSO *et al.*, 2011), bem como da

Tabela 8 - Parâmetros físico-químicos no início (T0) e ao final (Tf) do processo de DA nos reatores do Exp DM.

Reator	ST (g L <sup>-1</sup> )		SV (g L <sup>-1</sup> )		DQO (g O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )		TAN (mg L <sup>-1</sup> )		pH	
	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>f</sub>
C 1X	46,0	42,2 ± 0,5	26,0	22,6 ± 0,8	116,8	96,9 ± 13,7	1393,9	303,3 ± 33,0	8,9	7,5 ± 0,01
HP 1X	45,7	40,4 ± 1,9	26,5	21,8 ± 1,0	117,5	82,9 ± 6,4	1424,9	1026,7 ± 80,8	8,9	7,6 ± 0,02
PF 1X	46,5	40,7 ± 4,0	27,7	21,6 ± 1,6	117,5	63,6 ± 9,4	1506,1	1034,4 ± 337,8	8,9	7,7 ± 0,01
C 2X	51,4	44,5 ± 3,9	29,7	23,0 ± 0,8	123,1	89,4 ± 13,4	1434,5	466,7 ± 132,0	8,9	7,4 ± 0,01
HP 2X	51,0	40,3 ± 1,5	30,6	21,9 ± 0,3	124,5	74,6 ± 18,7	1496,4	1555,6 ± 297,3	8,9	7,9 ± 0,01
PF 2X	52,5	41,8 ± 2,6	33,1	23,3 ± 1,3	124,6	78,8 ± 14,6	1658,8	1718,9 ± 53,9	8,9	7,7 ± 0,02

ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; DQO: demanda química de oxigênio; TAN: nitrogênio amoniacal. t<sub>0</sub> = tempo inicial; t<sub>f</sub> = tempo final (83 dias).

atuação das bactérias metanogênicas, que produzem compostos alcalinos na forma de CO<sub>2</sub>, amônia e bicarbonato (APPELS *et al.*, 2008).

### 3.6.3 Produção acumulada de metano e seleção de modelo cinético

Quatro modelos matemáticos foram avaliados buscando selecionar o mais adequado à predição da cinética de produção acumulada de metano nas diferentes condições experimentais. Neste sentido, o modelo de Gompertz modificado foi escolhido por ter apresentado maiores coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e menores valores para o critério de Akaike em ambos inóculos (Tabela 9). A comparação entre os resultados experimentais e aqueles preditos pelo modelo selecionado apresentaram elevada correlação (Fig. 3).

A produção acumulada de metano (L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>) nas diferentes condições experimentais é ilustrada nas Figuras 4 a 7, como média e desvio padrão para cada condição (n = 3), sendo que as linhas representam o ajuste do modelo de Gompertz modificado aos dados experimentais obtidos. A Tabela 10 apresenta os coeficientes para os parâmetros do modelo de Gompertz modificado.

Tabela 9 - Informações sobre os modelos de produção acumulada de metano e dados de qualidade do ajuste para as condições de Co-DA.

Modelo	Inóculo	Nº total de parâmetros ajustados, $np$	Nº de pontos experimentais ajustados*, $n$	$R^2$ do ajuste*	Critério de informação de Akaike corrigido, AICc
Logistic modificado	DF DM	18	198 94	0,9689 0,9708	-1378 -824,2
Gompertz modificado	DF DM	18	198 94	0,9758 0,9880	-1428 -908
Richards/ Stannard modificado	DF DM	24	198 94	0,9759 0,9880	-1413 -886,5
Schnute modificado	DF DM	24	198 94	0,8632 0,9104	-1070 -697,9

\* Inclui dados de todos os experimentos realizados, incluindo o uso de dejetos fresco (DF) e dejetos maturado (DM), bem como as diversas composições do meio nas Co-DA.

Tabela 10 - Parâmetros do modelo de Gompertz modificado para produção acumulada de metano no Exp DF (DF) e Exp DM (DM) com diferentes co-substratos e concentrações.

Reator	Taxa máxima de produção de metano, $\mu_m$ (mL CH <sub>4</sub> (g SV) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Produção máxima de metano, A (L CH <sub>4</sub> (g SV) <sup>-1</sup> )		Fase lag, $\lambda$ (h)		$R^2$	
	DF	DM	DF	DM	DF	DM	DF	DM
	C 1X	1,4685	0,1282	0,4542	0,1102	31,7	14,3	0,9919
HP 1X	1,0820	0,2661	0,4784	0,1436	30,9	0,0	0,9967	0,9621
PF 1X	1,2276	0,0975	0,4253	0,1283	9,2	122,4	0,9525	0,9972
C 2X	1,2563	0,1877	0,4508	0,1615	7,9	0,0	0,9799	0,9716
HP 2X	0,1442	0,3224	0,6471	0,1857	11,8	52,1	0,9660	0,9953
PF 2X	0,9026	0,1237	0,4000	0,1706	0,0	164,1	0,9014	0,9986

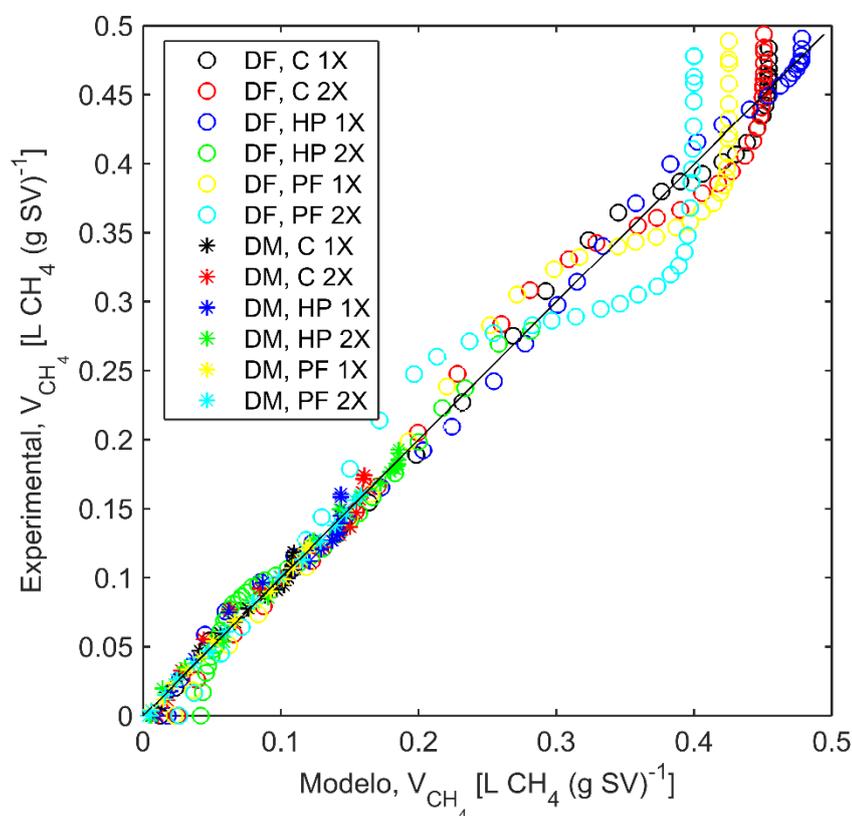


Figura 3 - Resultados experimentais e preditos pelo modelo de Gompertz ( $R^2 = 0.9834$ ).

No Exp DF, usando dejetto fresco de suínos (DF) como inóculo/substrato, os reatores 1X apresentaram tempos de fase *lag* similares considerando o tempo total de DA (Tabela 10), exibindo produção de metano comparável entre co-substratos até 143 h de incubação (Fig. 4).

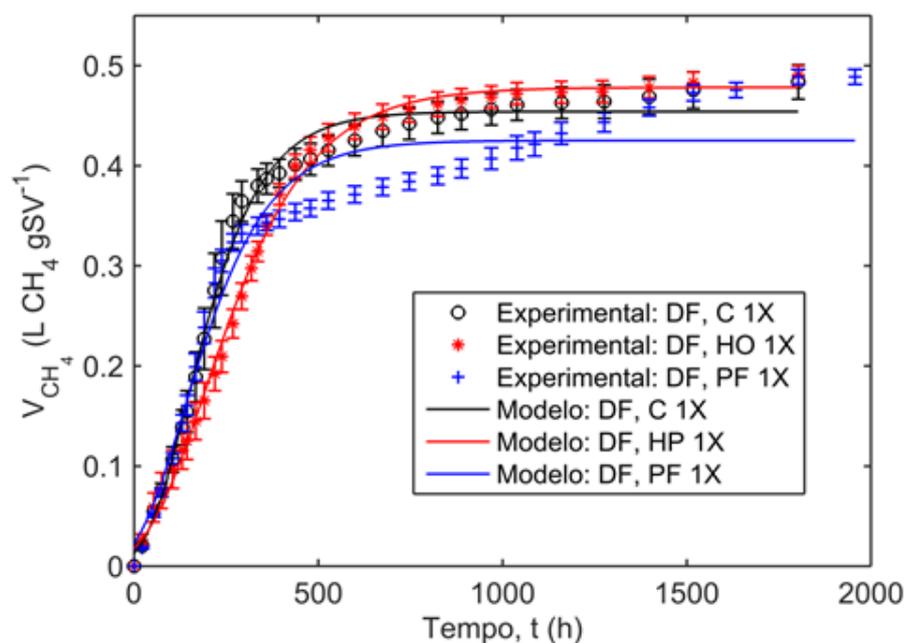


Figura 4 - Produção cumulativa de metano ( $\text{L CH}_4 (\text{g SV})^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbia de dejetto fresco de suínos (DF; inóculo/substrato principal) e co-substratos em reatores com 5,67 % ST – Exp1. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 28,5 % ST (1X). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado.

A partir deste ponto, pequeno retardamento da produção de metano pode ser observada nos reatores HP1X, indicada pela menor declividade da curva de produção de metano (Fig. 4), refletindo em menor taxa máxima de produção de metano ( $\mu_m$ ; Tabela 7). No entanto, a partir de 437 h de Co-DA, a produção acumulada de metano nos reatores HP1X apresentou-se similar aos C1X. Comparando os reatores C1X e PF1X, menor produção foi mensurada para os últimos no intervalo 268-1270 h. Ao final da biodigestão, as produções acumuladas de metano entre os co-substratos 1X foram comparáveis (Tabelas 10 e 11), similares estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

Tabela 11 - Produção final de metano nos reatores do Exp DF, e percentual de aumento da produção nos reatores HP e PF em relação aos controles (C).

Reator	Média de produção de metano (L CH <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> )	Aumento de produção de CH <sub>4</sub> em relação ao controle (%)	Produção de CH <sub>4</sub> baseada nos ST (L CH <sub>4</sub> (g ST) <sup>-1</sup> )	Aumento de produção de CH <sub>4</sub> em relação ao controle (%)	Produção de CH <sub>4</sub> baseada nos SV (L CH <sub>4</sub> (g SV) <sup>-1</sup> )	Aumento de produção de CH <sub>4</sub> em relação ao controle (%)
C 1X	17,51		0,31		0,48	
HP 1X	19,18	9,54	0,34	8,84	0,49	1,47
PF 1X	18,76	7,13	0,33	6,78	0,49	1,07
C 2X	21,63		0,32		0,49	
HP 2X	13,83	-36,08	0,20	-36,74	0,28	-43,48
PF 2X	23,01	6,38	0,34	5,82	0,48	-3,18

Ainda no Exp DF, diferenças expressivas foram observadas no comportamento da produção de metano entre os co-substratos na concentração 2X (Fig. 5). Embora os tempos de fase *lag* tenham diferido em poucas horas, a velocidade específica de crescimento foi inferior nos reatores HP2X (Tabela 10). Menor produção acumulada foi mensurada nos reatores HP2X, quando comparada à produção em C2X e PF2X (Fig. 5).

Produção acumulada similar foi observada nos reatores C2X e PF2X até 143 h de incubação; contudo, diminuição da produção nos reatores PF2X, em relação aos C2X, foi detectada até 1520 h de bioprocessamento (Fig. 5), replicando com maior intensidade o que ocorreu nos reatores PF1X (Fig. 4). As produções acumuladas de metano em C2X (0,48 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>) e PF2X (0,49 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>) foram distintas ( $p < 0,05$ ) entre si em relação aos reatores HP2X (0,28 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup>) (Tabela 11). Os dados experimentais indicam curva ascendente da produção acumulada de metano (Fig. 5), justificando o fato de o modelo de Gompertz modificado ter predito maior rendimento máximo de metano (Tabela 10) em relação ao rendimento real ao final do período experimental (Tabela 11).

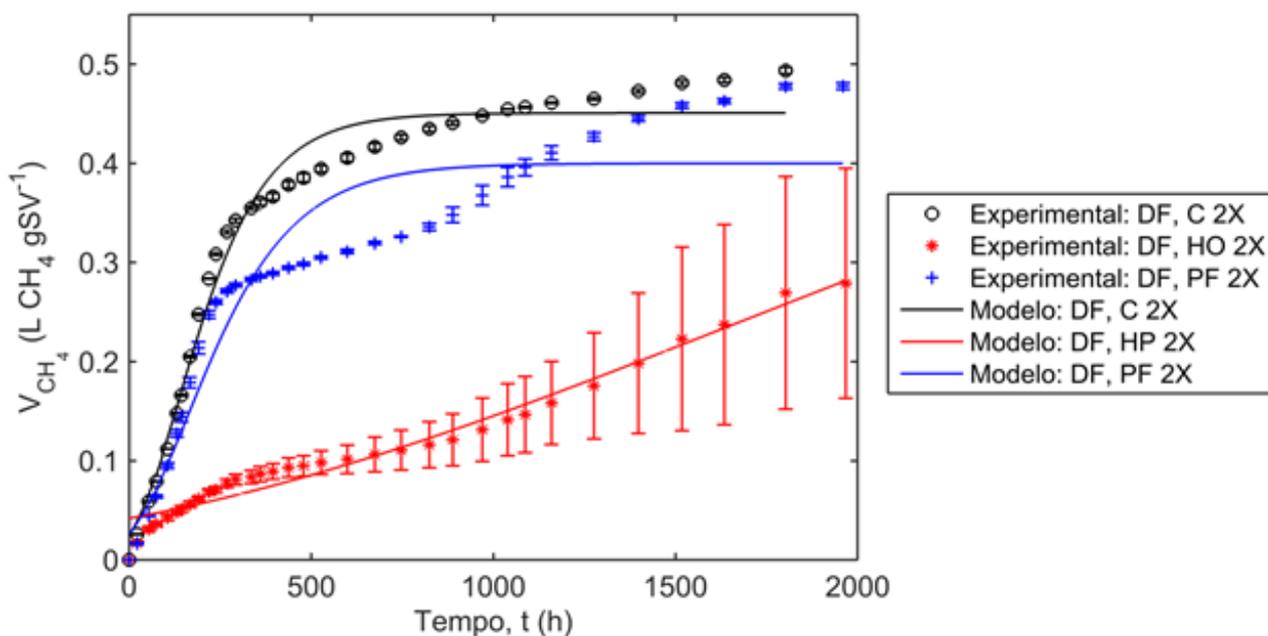


Figura 5 - Produção cumulativa de metano ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbia de dejetos frescos de suínos (DF; inóculo/substrato principal) e co-substratos em reatores com 6,77 % ST – Exp DF. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 40,4 % ST (2X). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado.

Os efeitos negativos nos reatores HP2X, ou seja, redução da taxa máxima de produção de metano (Tabela 10) e diminuição de 43% na produção de metano em relação a C2X (Tabela 11), podem estar relacionados à inibição por amônia (Tabela 7), fenômeno amplamente reconhecido e significativo para processos de DA, especialmente pelo efeito da amônia sobre bactérias metanogênicas. Teores inibitórios em diferentes processos de DA variam amplamente na faixa de 1.400-7.500  $mg TAN L^{-1}$ , dependendo do pH, temperatura, entre outros fatores (CHEN *et al.*, 2014; RAJAGOPAL *et al.*, 2013). Considerando que valores relativamente elevados também foram mensurados nos reatores PF2X (Tabela 7), a concentração de amônia nestes reatores pode não ter alcançado níveis inibitórios para o inóculo utilizado (FORGÁCS *et al.*, 2013). Em estudo prévio de DA de penas com lodo granular anaeróbio de indústria cervejeira, valores de 2.720-2.810  $mg NH_4^+-N L^{-1}$  inibiram a metanogênese, enquanto que nos reatores com a maior produção de metano os valores finais alcançaram 1.740  $mg NH_4^+-N L^{-1}$  (COSTA *et al.*, 2012b). Níveis finais de TAN mais elevados (6.900  $mg TAN L^{-1}$ ) foram reportados por Xia *et al.*, (2012b) na DA de penas

de frango utilizando dejetos de suíno estabilizado como inóculo, sem observar inibição do rendimento de metano, indicando que diferentes grupos da comunidade metanogênica possuem sensibilidade distinta à inibição/toxicidade por amônia.

A diminuição transitória da produção de metano nos reatores PF1X (268-1270 h; Fig. 4) e PF2X (143-1520 h; Fig. 5), bem como as menores taxas máximas de produção de metano ( $\mu_m$ ) em PF1X e PF2X com relação aos reatores C1X e C2X (Tabela 10), podem não estar necessariamente relacionados à inibição por amônia, considerando a concentração final similar de TAN em C1X (Tabela 7) e a produção final de metano em C2X e PF2X (Fig. 5; Tabela 11). No Exp DF, os materiais orgânicos facilmente decomponíveis do DF podem ter sido utilizados preferencialmente pela microbiota no início da Co-DA (APPELS *et al.*, 2008; MOUKAZIS *et al.*, 2018). Como as penas são materiais recalcitrantes, a diminuição temporária na produção de metano pode ser devida à relativa dificuldade de hidrólise nos reatores para sua subsequente conversão nos produtos da DA (SALMINEN *et al.*, 2003).

No Exp DM, utilizando dejetos maturados de suínos (DM) como inóculo (Fig. 6 e 7), a produção acumulada de metano foi inferior àquela no Exp DF (Fig. 4 e 5), que pode estar relacionada às diferenças entre DF e DM (Tabela 6) e à menor concentração inicial de SV no Exp DM (Tabela 8).

Considerando os reatores 1X do Exp DM, HP1X demonstrou incremento ( $p < 0,05$ ) na produção final de metano em relação aos reatores C1X e PF1X (Fig. 6). Segundo o modelo matemático, maior velocidade específica de crescimento foi observada nos reatores HP1X, seguidos pelos reatores C1X e PF1X (Tabela 10). Nos reatores HP1X, valores acumulados de  $0,16 \text{ L CH}_4 (\text{g SV})^{-1}$  foram mensurados, resultados 35,5 % superiores e significativos ao C1X (Tabela 12). Em contrapartida, a produção acumulada de metano nos reatores PF1X foi menor do que nos reatores C1X até 980 h de biodigestão (Fig. 6); contudo, as produções finais de metano foram similares ( $p > 0,05$ ) entre estes reatores (Tabelas 10 e 12).

Desempenho similar quanto ao perfil das curvas de produção acumulada de metano foi observado nos reatores 2X (Fig. 7). Ao final da Co-DA, 0,19, 0,17 e 0,16  $\text{L CH}_4 (\text{g SV})^{-1}$  foram produzidos nos reatores HP2X, C2X e PF2X, respectivamente (Tabela 12). A maior produção de metano durante a Co-DA foi mensurada para os reatores HP2X ( $p < 0,05$ ), representando valores 9,7 % superiores ao C2X (Tabela 12); no entanto, diferenças em relação aos reatores C2X foram observadas somente

após 233 h de DA. Os reatores PF2X resultaram na menor produção acumulada de metano entre os co-substratos testados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12).

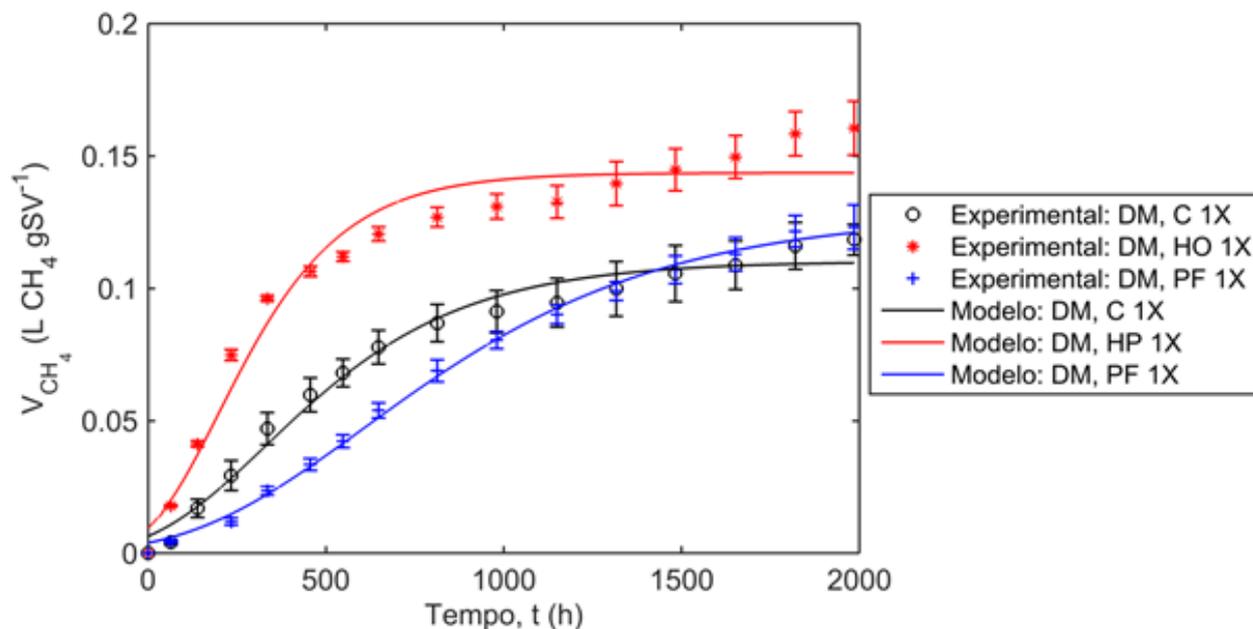


Figura 6 - Produção cumulativa de metano ( $\text{L CH}_4 (\text{g SV})^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbia de dejetos maturados de suínos (DM; inóculo) e co-substratos em reatores com 4,60 % ST – Exp DM. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 12,1 % ST (1X). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado.

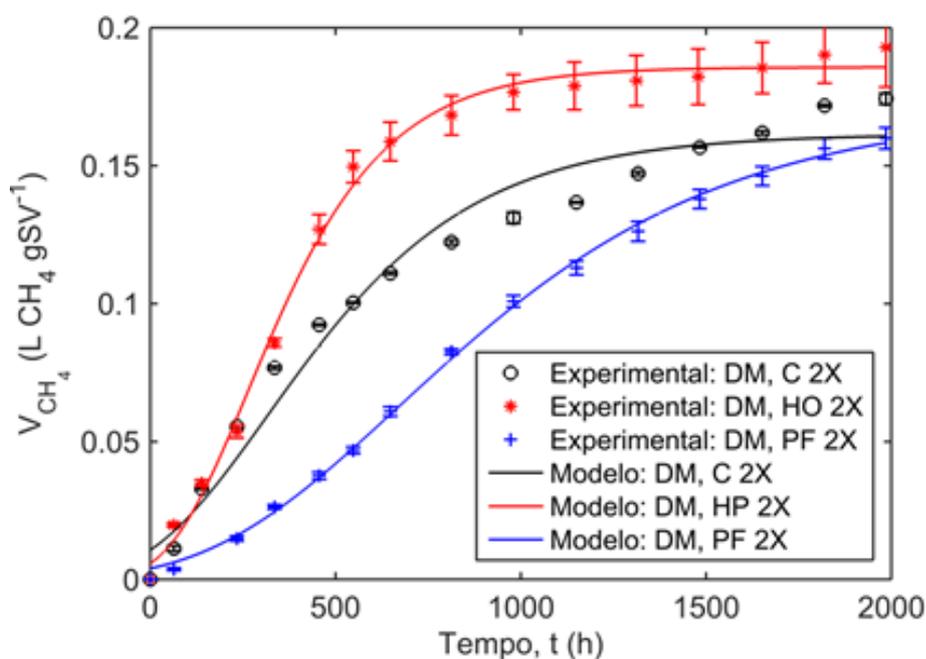


Figura 7 - Produção cumulativa de metano ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ ) durante a co-digestão anaeróbia de dejetos maturados de suínos (DM; inóculo) e co-substratos em reatores com 5,11 % ST (2X) – Exp DM. Os co-substratos controle (C), hidrolisado de penas (HP) e penas fragmentadas (PF) corresponderam a 20,6 % ST. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ); as linhas indicam o ajuste do modelo de Gompertz modificado.

Tabela 12 - Produção final de metano nos reatores do Exp DM, e percentual de aumento da produção nos reatores HP e PF em relação aos controles (C).

Reator	Média de produção de metano ( $L CH_4 L^{-1}$ )	Aumento de produção de $CH_4$ em relação aos controles (%)	Produção de $CH_4$ baseada nos ST ( $L CH_4 (g ST)^{-1}$ )	Aumento de produção de $CH_4$ em relação aos controles (%)	Produção de $CH_4$ baseada nos SV ( $L CH_4 (g SV)^{-1}$ )	Aumento de produção de $CH_4$ em relação ao controle (%)
C 1X	3,08		0,07		0,12	
HP 1X	4,25	37,90	0,09	38,58	0,16	35,57
PF 1X	3,38	9,62	0,07	8,41	0,12	2,99
C 2X	5,18		0,10		0,17	
HP 2X	5,85	13,02	0,11	14,02	0,19	9,72
PF 2X	5,29	2,13	0,10	0,13	0,16	-8,22

O comportamento dos reatores PF no Exp DM (Fig. 6 e 7) reforça a noção de que a hidrólise das penas nestes reatores atuou como fator limitante para a DA e produção de metano. Particularmente, tempos de fase *lag* de 122-164 h foram obtidos para os reatores PF1X e PF2X no Exp DM (Tabela 10). Xia *et al.*, (2011) indicaram que a adição de penas moídas em processo de DA (153 dias; dejetos suínos estabilizados como inóculo) resultou em aumento da população de microrganismos queratinolíticos nos biodigestores, em função do tempo, até os 80 dias de DA, fenômeno diretamente relacionado à taxa de digestão das penas.

Assim, o pré-tratamento microbiano das penas (hidrólise das penas por *Bacillus* sp. CL18) beneficiou a produção de metano utilizando o inóculo DM, ou seja usando inóculo com menor fração de materiais facilmente decomponíveis do que o dejetos frescos (DF). Neste sentido, um dos fundamentos dos pré-tratamentos de biomassa reside exatamente no incremento da concentração de compostos de maior

biodegradabilidade para acelerar/otimizar a DA e incrementar a produção de metano (MEEGODA *et al.*, 2018).

A utilização de penas, com ou sem pré-tratamentos, para processos de Co-DA é pouco explorada (FORGÁCS *et al.*, 2014; PATINVOH *et al.*, 2016) quando comparada ao uso de outros resíduos orgânicos (RAPOSO *et al.*, 2011), embora as penas sejam abundantes resíduos da indústria avícola. A DA de penas moídas, utilizando dejetos suíno estabilizado como inóculo, resultou em produção acumulada de metano 84% superior àquela observada sem adição de penas após 153 dias de DA (XIA *et al.*, 2011). Aumentos na produção de metano também foram reportados, em menor proporção, na DA de penas utilizando diferentes inóculos estabilizados, em comparação aos inóculos sem a adição de penas (XIA *et al.*, 2012b). Xia *et al.*, (2012a) verificaram tendência de maior rendimento de metano em menor tempo, em processos de DA com a adição de penas moídas do que sem a adição, sugerindo que as penas poderiam ser adicionadas sem afetar negativamente o rendimento de metano.

Costa *et al.*, (2012b), avaliando a produção de metano durante o processo de DA de penas de frango inteiras e penas pré-tratadas termoquimicamente, reportaram a diminuição temporária da produção de metano durante o processo, similarmente ao observado para a PF no Exp DF (Fig. 4 e 5). Ao final de 80 dias, a produção de metano com penas inteiras atingiu  $0,123 \text{ L CH}_4 \text{ (g SV)}^{-1}$ , comparável ao apresentado na Tabela 12. Contudo, o aumento da solubilidade das penas através do pré-tratamento resultou em redução de 14-79% na produção final de metano, concluindo que o fator limitante foi a conversão da matéria orgânica solúvel, e não a taxa de hidrólise (COSTA *et al.*, 2012b), o que difere do presente estudo (exceção aos reatores DF-HP2X; Fig. 5).

Diferentes pré-tratamentos de penas foram investigados por Salminen *et al.*, (2003) no intuito de aumentar o rendimento de metano. Pré-tratamentos térmicos, químicos ou enzimáticos incrementaram a produção de metano em 5-32%, enquanto que a combinação de tratamentos térmicos e enzimáticos resultou em aumento de 37-51% no rendimento de metano em relação às penas sem pré-tratamento.

O pré-tratamento hidrotérmico (autoclave), enzimático ou combinado (hidrotérmico + enzimático) de penas fragmentadas ocasionou aumento da produção de metano, em comparação às penas não pré-tratadas, após nove dias de DA em condições termofílicas utilizando como inóculo material de digestor municipal de

resíduos sólidos. Ao final de 50 dias de de DA, os rendimentos de metano foram superiores (108-122%) com a utilização de pré-tratamentos enzimáticos (FORGÁCS *et al.*, 2013). Segundo estes autores, os maiores índices de solubilização das penas não resultaram nos maiores rendimentos de metano, atribuindo tal fenômeno a possíveis fatores inibitórios, especialmente a rápida acumulação de amônia nos reatores de DA. Já Forgács *et al.* (2014) indicaram que o tratamento termoquímico de penas (hidrólise alcalina) foi eficiente para a solubilização destes resíduos orgânicos, incrementando o rendimento de metano (97-105%), em comparação com penas moídas, durante DA realizada em condições termofílicas.

A DA de penas fragmentadas, realizada em condições termofílicas com inóculo oriundo de digestor municipal de resíduos sólidos, resultou em produção acumulada de metano de 0,18 L CH<sub>4</sub> (g SV)<sup>-1</sup> após 50 dias (FORGÁCS *et al.*, 2011). Pré-tratamentos microbianos das penas (por 1-8 dias), utilizando a bactéria queratinolítica *Bacillus licheniformis* ATCC 53757 ou *Bacillus megaterium* recombinante (expressando a queratinase de *B. licheniformis*), resultaram em incrementos de 55% e 122% na produção acumulada de metano, respectivamente, quando comparadas às penas fragmentas, indicando o pré-tratamento microbiano como uma alternativa economicamente viável e ambientalmente adequada para a destinação das penas (FORGÁCS *et al.*, 2011).

Hidrolisados de pena produzidos por *Bacillus* sp. C<sub>4</sub> foram utilizados em processo de DA realizado em condições mesofílicas usando como inóculo lodo anaeróbico digerido de estação de tratamento de esgotos ou lodo granular de reator anaeróbico de fluxo ascendente. Embora tenham ocorrido diferenças na produção de metano dependendo do inóculo, o pré-tratamento microbiano resultou em incremento da produção de metano (de até 124%) em relação às penas não pré-tratadas (PATINVOH *et al.*, 2016).

Mézes; Tamás (2015) investigaram a adição de penas, pré-tratadas através da fermentação em estado sólido com *Bacillus licheniformis* KK1, sobre a produção de metano em condições mesofílicas utilizando inóculo obtido de planta de produção de biogás. Estes autores verificaram que a adição de penas pré-tratadas (5 %) resultou em produção de metano similar aos reatores sem a adição de penas. Contudo, o uso de maior proporção de penas pré-tratadas (7,5-20,0 %) afetou negativamente o rendimento de metano, possivelmente devido ao efeito inibitório de sub-produtos da DA das penas, como a amônia (MÉZES; TAMÁS, 2015). Neste contexto, não somente

o tipo de pré-tratamento, mas também a concentração das penas pré-tratadas associa-se a outros parâmetros investigados em processos de Co-DA, como a natureza e concentração do inóculo.

### 3.7 CONCLUSÃO

Nas condições investigadas, há a possibilidade de adição de PF em processos de Co-DA com DF e DM. Mesmo considerando a redução transitória da produção de metano pela presença de PF, não houve prejuízo relevante para o rendimento final.

Efeitos mais proeminentes foram detectados quando do uso de HP nos processos de Co-DA. Na Co-DA com DF, a concentração de HP demonstrou ser fator importante para o resultado do processo. Embora HP1X não tenha afetado sobremaneira a produção de metano na Co-DA com DF, concentração mais elevada de HP (HP2X) causou significativa redução da produção acumulada de metano, possivelmente pelo efeito inibitório de elevadas concentrações de TAN.

Nos reatores utilizando DM como inóculo, a adição de HP foi benéfica para a produção de metano em comparação com PF e controles (C), evidenciando que o pré-tratamento microbiano das penas, ou seja, a hidrólise das penas através de cultivos submersos com *Bacillus* sp. CL18, é estratégia promissora a ser considerada objetivando aumentar o rendimento de metano a partir das penas. Deste modo, os hidrolisados de pena podem ser também aplicados como fontes de nutrientes, especialmente nitrogênio, para o balanço nutricional da DA de resíduos pobres em nitrogênio. Em dejetos suínos sugere-se a adição de HP de aproximadamente 25 % do total de ST presentes no sistema.

Os efluentes destes processos de Co-DA merecem atenção na perspectiva de sua aplicação como potenciais fertilizantes para culturas agrícolas.

### 3.8 REFERÊNCIAS

AKAIKE, H.. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. **Second International Symposium on Information Theory**, 1973.

APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755–781, 2008.

APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WEF (Water Environment Federation). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21<sup>a</sup> Ed. Washington – DC: APHA, 2005.

BARRET, M. *et al.* Physico-chemical characteristics and methanogen communities in swine and dairy manure storage tanks: Spatio-temporal variations and impact on methanogenic activity. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 737–746, 2013.

BATSTONE, D. J.; VIRDIS, B. The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 142–149, 2014.

BOE, K.; ANGELIDAKI, I.. Serial CSTR digester configuration for improving biogas production from manure. **Water Research**, v. 43, n. 1, p. 166–172, 2009.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A.. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 85, p. 1735–1750, 2010.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; JULIANO, S.. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3–12, 2015.

CALLEGARO, K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J.. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 1–9, 2018.

CARLSSON, M.; LAGERKVIST, A.; MORGAN-SAGASTUME, F.. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. **Waste Management**, v. 32, n. 9, p. 1634–1650, 2012.

CHEN, J. L. *et al.* Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1523–1534, 2014.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos. **Reatores anaeróbios**. 2ª Ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1997.

COLEMAN, T. F.; LI, Y.. An Interior Trust Region Approach for Nonlinear Minimization Subject to Bounds. **SIAM Journal on Optimization**, v. 6, n. 2, p. 418–445, 1996.

CÓRDOBA, V.; FERNÁNDEZ, M.; SANTALLA, E.. The effect of different inoculums on anaerobic digestion of swine wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 115–122, 2016.

COSTA, J C *et al.* Bioresource Technology Thermochemical pre- and biological co-treatments to improve hydrolysis and methane production from poultry litter. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 141–147, 2012b.

COSTA, J C; BARBOSA, S G; SOUSA, D Z. Effects of pre-treatment and bioaugmentation strategies on the anaerobic digestion of chicken feathers. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 114–119, 2012a.

DAI, X. *et al.* Simultaneous enhancement of methane production and methane content in biogas from waste activated sludge and perennial ryegrass anaerobic co-digestion : The effects of pH and C / N ratio. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 323–330, 2016.

FORGÁCS, G. *et al.* Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1747–1753, 2011.

FORGÁCS, G. *et al.* Methane Production from Feather Waste Pretreated with Ca(OH)<sub>2</sub>: Process Development and Economical Analysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 65–73, 2014.

FORGÁCS, G. *et al.* Pretreatment of Chicken Feather Waste for Improved Biogas Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2013, p. 2016–2028, 2013.

GOMPERTZ, B.. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter

to Francis Baily, Esq. F. R. S. &c. **Phil. Trans. R. Soc. Lond**, v. 115, p. 513–583, 1825.

GUWY, A J. Equipment used for testing anaerobic biodegradability and activity. **Environmental Science and Biotechnology**, v. 3, p. 131–139, 2004.

HAFNER, Sasha D; BISOGNI, James J. Modeling of ammonia speciation in anaerobic digesters. **Water Research**, v. 43, n. 17, p. 4105–4114, 2009.

HAGOS, K. *et al.* Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. November 2016, p. 1485–1496, 2017.

HURVICH, C. M.; TSAI, C. L.. Bias of the corrected aic criterion for underfitted regression and time series models. **Biometrika**, v. 78, n. 3, p. 499–509, 1991.

JIMÉNEZ, J. *et al.* Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 703–714, 2015.

KHALID, A. *et al.* The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, v. 31, p. 1737–1744, 2011.

LIOTTA, F. *et al.* Effect of total solids content on methane and volatile fatty acid production in anaerobic digestion of food waste. **Waste Management & Research**, v. 32, p. 947–953, 2014.

LOHANI, S. P; HAVUKAINEN, J.. Anaerobic Digestion : Factors Affecting Anaerobic Digestion Process. **Waste Bioremediation**, 2018.

MEEGODA, J. N *et al.* A Review of the Processes , Parameters , and Optimization of Anaerobic Digestion. **Environmental Resarch ando Public Health**, 2018.

MÉZES, L.; TAMÁS, J.. Feather Waste Recycling for Biogas Production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, p. 899–911, 2015.

MONTE BLANCO, S. P. D. *et al.* Kinetic, equilibrium and thermodynamic phenomenological modeling of reactive dye adsorption onto polymeric adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 466–475, jan. 2017.

MOUKAZIS, I.; PELLERA, F.; GIDARAKOS, E.. Slaughterhouse by-products treatment using anaerobic digestion. **Waste Management**, v. 71, p. 652–662, 2018.

NIELSEN, H. B.; ANGELIDAKI, I.. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7995–8001, 2008.

PATINVOH, R. J. *et al.* Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 13–24, 2017.

PATINVOH, R.J *et al.* Biological Pretreatment of Chicken Feather and Biogas Production from Total Broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1401–1415, 2016.

PATINVOH, R. J *et al.* Dry Anaerobic Co-Digestion of Citrus Wastes with Keratin and Lignocellulosic Wastes : Batch And Continuous Processes. **Waste and Biomass Valorization**, 2018.

RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D. I.; SINGH, G.. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 632–641, 2013.

RAPOSO, F. *et al.* Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode : An overview relating to methane yields and experimental procedures. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 861–877, 2011.

RICHARDS, F. J. A flexible growth curve for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v. 10, n. 2, p. 290–300, 1959.

SALMINEN, E; EINOLA, J; RINTALA, J. The methane production of poultry slaughtering residues and effects of pre - treatments on the methane production of poultry feather. **Environmental Technology**, v. 24, p. 1079–1086, 2003.

SALMINEN, E. A; RINTALA, J. A. Semi-continuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste : effect of hydraulic retention time and loading. **Water Research**, v. 36, p. 3175–3182, 2002.

SCHNUTE, J. A V. Growth Model with Statistically Stable Parameters. **Canadian**

**Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, n. 9, p. 1128–1140, 1981.

SHANMUGAM, P; HORAN, N J. Simple and rapid methods to evaluate methane potential and biomass yield for a range of mixed solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 471–474, 2009.

STANNARD, C J; WILLIAMS, A P; GIBBS, P A. Temperature / growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. **Food Microbiology**, v. 2, p. 115–122, 1985.

WANG, B. *et al.* Determination of methane yield of cellulose using different experimental setups different experimental setups. **Water Science & Technology**, v. 70, p. 599-604, 2014.

WICKHAM, R. *et al.* Biomethane potential evaluation of co-digestion of sewage sludge and organic wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 3–8, 2016.

XIA, Y. *et al.* Anaerobic digestibility of beef hooves with swine manure or slaughterhouse sludge. **Waste Management**, v. 38, p. 443–448, 2015.

XIA, Y. *et al.* Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. **Waste Management**, v. 32, n. 3, p. 404–409, 2012a.

XIA, Y. *et al.* Identity and diversity of archaeal communities during anaerobic co-digestion of chicken feathers and other animal wastes. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 111–119, 2012b.

XIA, Y. *et al.* In situ identification of keratin-hydrolyzing organisms in swine manure inoculated anaerobic digesters. **Fems Microbiology Ecology**, v. 78, p. 451–462, 2011.

XIE, S.; WICKHAM, R.; NGHIEM, L. D. Synergistic effect from anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 191–197, 2017.

ZWIETERING, M H *et al.* Modeling of the Bacterial Growth Curve Downloaded from. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.

## 3.9 MATERIAL SUPLEMENTAR

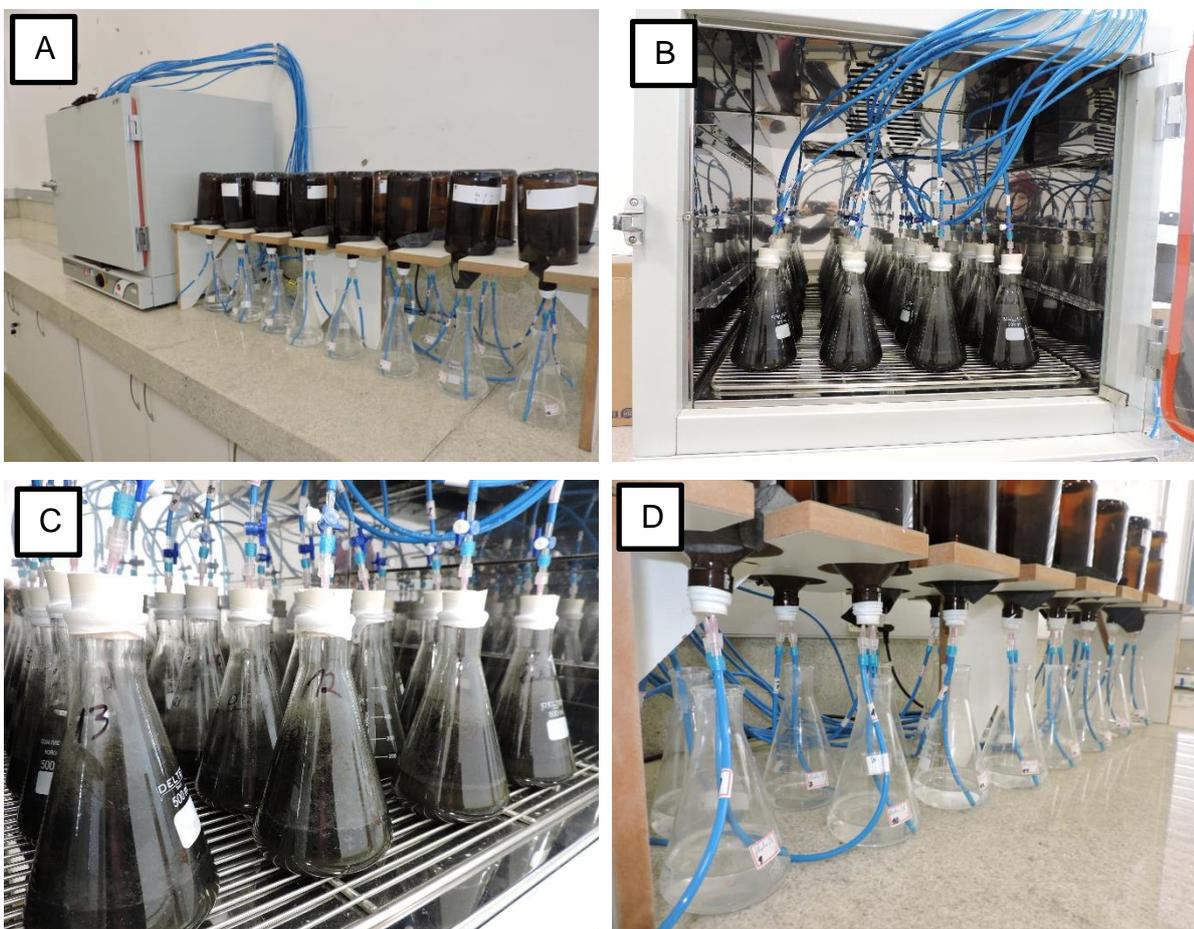


Figura S1 - Sistema utilizado nos experimentos de produção de metano. (A) Visão geral; (B) Disposição dos reatores anaeróbios no interior da estufa; (C) Detalhe dos reatores contendo inóculo e substratos; (D) Sistema de lavagem de biogás e medição do metano produzido.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O manejo de resíduos orgânicos é desafio contínuo enfrentado pelas instâncias responsáveis por sua produção, especialmente pelo seu potencial poluidor. De forma particular, a recalcitrância de diversos resíduos surge como fator complicador para sua adequada destinação e reciclagem.

Os hidrolisados de pena obtidos através de pré-tratamento microbiano apresentaram potencial para otimizar o desempenho da DA, quando comparados ao próprio dejetos e às penas que não foram submetidas a este pré-tratamento. Sugere-se que os hidrolisados de pena possam ser também aplicados como fontes de nutrientes, especialmente nitrogênio, para o balanço nutricional da DA de resíduos pobres em nitrogênio.

Como para qualquer bioprocessos, as variáveis relacionadas devem ser caracterizadas, de modo que a aplicação de penas/hidrolisados seja benéfica para a produção de metano. Desta forma, é possível otimizar a DA no contexto do tratamento e concomitante agregação de valor a estes abundantes resíduos orgânicos. Ressalta-se que as proporções de penas/hidrolisado utilizadas neste estudo foram superiores às empregadas em outras investigações.

Embora dejetos de suínos sejam amplamente utilizados em processos de DA, e de forma crescente, o mesmo não é observado para penas de frango. Considerando a ampla disponibilidade destes dois tipos de resíduos, o uso de dejetos de suínos e a aplicação de penas/hidrolisados como co-substratos em processos de DA representa abordagem atraente na perspectiva da aproximação com uma produção mais sustentável.

Como perspectiva também se destaca a análise qualitativa do gás produzido no sistema. Além disso, a aplicação de Co-DA de dejetos suíno e penas pré-tratadas em escala real em biodigestores em operação, reatores batelada e reatores contínuos. Finalmente, a potencialidade de aplicação do produto final da Co-DA como fertilizante agrícola, com a avaliação do seu potencial nutricional e toxicológico.

## REFERÊNCIAS

ABOUELENIEN, F. *et al.* Improved methane fermentation of chicken manure via ammonia removal by biogas recycle. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6368–6373, 2010.

ANGENENT, L. T.; SUNG, S.; RASKIN, L.. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. **Water Research**, v. 36, n. 18, p. 4648–4654, 2002.

APPELS, L. *et al.* Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 755–781, 2008.

AQUINO, S. F. *et al.* Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 192–201, 2007.

ASTALS, S. *et al.* Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 421–427, 2014.

ASTALS, S; ARISO, M; GALÍ, A. Co-digestion of pig manure and glycerine: Experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091–1096, 2011.

BAO, N. *et al.* An overview of food waste management in developing countries: Current status and future perspective. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 220–229, 2015.

BARRET, M. *et al.* Physico-chemical characteristics and methanogen communities in swine and dairy manure storage tanks: Spatio-temporal variations and impact on methanogenic activity. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 737–746, 2013.

BATSTONE, D. J; VAVILIN, V.. **Anaerobic digestion model No 1**. v. 1, n. 1, 2002.

BATSTONE, D. J.; VIRDIS, B.. The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 142–149, 2014.

BOE, K.; ANGELIDAKI, I.. Serial CSTR digester configuration for improving biogas

production from manure. **Water Research**, v. 43, n. 1, p. 166–172, 2009.

BOHUTSKYI, P. *et al.* Synergistic co-digestion of wastewater grown algae-bacteria polyculture biomass and cellulose to optimize carbon-to-nitrogen ratio and application of kinetic models to predict anaerobic digestion energy balance. **Bioresource Technology**, v. 269, n. June, p. 210–220, 2018.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; JULIANO, S.. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3–12, 2015.

BUJOCZEK, G *et al.* High Solid Anaerobic Digestion of Chicken Manure. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 76, p. 51–60, 2000.

CALLEGARO, K.; WELTER, N.; DAROIT, D. J.. Feathers as bioresource: Microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, n. September, p. 1–9, 2018.

CARLSSON, M.; LAGERKVIST, A.; MORGAN-SAGASTUME, F.. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. **Waste Management**, v. 32, n. 9, p. 1634–1650, 2012.

CAVINATO, C *et al.* Thermophilic anaerobic co-digestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: Comparison of pilot and full scale experiences. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 545–550, 2010.

CHEN, J. L. *et al.* Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1523–1534, 2014.

CHEN, Y R. Kinetic Analysis of Anaerobic Digestion of Pig Manure and its Design Implications. **Agricultural Wastes**, v. 8, p. 65–81, 1983.

CHEN, Y.; CHENG, J. J; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process : A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044–4064, 2008.

CÓRDOBA, V.; FERNÁNDEZ, M.; SANTALLA, E.. The effect of different inoculums on anaerobic digestion of swine wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 115–122, 2016.

CORRÊA, A. P.F; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A.. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1–6, 2010.

COSTA, J C *et al.* Thermochemical pre- and biological co-treatments to improve hydrolysis and methane production from poultry litter. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 141–147, 2012b.

COSTA, J C; BARBOSA, S G; SOUSA, D Z. Effects of pre-treatment and bioaugmentation strategies on the anaerobic digestion of chicken feathers. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 114–119, 2012a.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F; BRANDELLI, A.. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DENG, L. *et al.* Kinetics of temperature effects and its significance to the heating strategy for anaerobic digestion of swine wastewater. **Applied Energy**, v. 134, p. 349–355, 2014.

DUNG, T. N. B.; SEN, B.; CHEN, C.. Food waste to bioenergy via anaerobic processes. **Energy Procedia**, v. 61, p. 307–312, 2014.

EMBRAPA. **Estatísticas suínos e aves**, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>> Acesso em: 15 dezembro de 2018.

FAKHFAKH, N. *et al.* Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium , *Bacillus pumilus* A1 , and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1731–1737, 2011.

FERNANDES, T V *et al.* Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2575–2579, 2009.

FERNÁNDEZ, J; PÉREZ, M; ROMERO, L I. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion

of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of initial total solid concentration. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6322–6328, 2010.

FERRER, I. *et al.* Increasing biogas production by thermal ( 70 ° C ) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 186–192, 2008.

FIERRO, J *et al.* Valorisation of used cooking oil sludge by codigestion with swine manure. **Waste Management**, v. 34, p. 1537–1545, 2014a.

FIERRO, J.; GÓMEZ, X.; MURPHY, J. D. What is the resource of second generation gaseous transport biofuels based on pig slurries in Spain **Applied Energy**, v. 114, p. 783–789, 2014b.

FONTOURA, R. *et al.* Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. **New Biotechnology**, p. 0–1, 2018.

FORGÁCS, G.; ALINEZHAD, S.; *et al.* Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1747–1753, 2011.

FORGÁCS, G. *et al.* Methane Production from Feather Waste Pretreated with Ca ( OH ) 2: Process Development and Economical Analysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 65–73, 2014.

FORGÁCS, G.; LUNDIN, M.. Pretreatment of Chicken Feather Waste for Improved Biogas Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2013, p. 2016–2028, 2013.

GOMPertz, B.. On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. F. R. S. &c. **Phil. Trans. R. Soc. Lond**, v. 115, p. 513–583, 1825.

GONZÁLEZ, L. M. L.; REYES, I. P.; ROMERO, O.. Anaerobic co-digestion of sugarcane press mud with vinasse on methane yield. **Waste Management**, v. 68, p. 139–145, 2017.

HAAG, N. *et al.* Methane formation potential of cup plant ( *Silphium perfoliatum* ).

**Biomass and Bioenergy**, v. 75, p. 126–133, 2015.

HAGOS, K. *et al.* Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. November 2016, p. 1485–1496, 2017.

HANSEN, K. H.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K.. Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. **Water Research**, v. 32, n. 1, p. 5–12, 1998.

HILLS, D. J. Effects of carbon: Nitrogen ratio on anaerobic digestion of dairy manure. **Agricultural Wastes**, v. 1, n. 4, p. 267–278, 1979.

HOBBS, S. R. *et al.* Enhancing anaerobic digestion of food waste through biochemical methane potential assays at different substrate: inoculum ratios. **Waste Management**, v. 71, p. 612–617, 2018.

HOLDER, N. *et al.* New Small Scale Bioreactor System for the Determination of the Biochemical Methane Potential. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0, 2017.

HOLM-NIELSEN, J B; SEADI, T AI; OLESKOWICZ-POPIEL, P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5478–5484, 2009.

HWANG, K. *et al.* Effects of prolonged starvation on methanogenic population dynamics in anaerobic digestion of swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. SUPPL.1, p. S2–S6, 2010.

IBGE. Indicadores IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, p. 33, 2018.

IWA. *Anaerobic digestion model no1 (adm1). Iwa task group for mathematical modelling of anaerobic wastewater processes.* , 2002

IZUMI, K. *et al.* International Biodeterioration & Biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 601–608, 2010.

JIMÉNEZ, J. *et al.* Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as

inorganic additive. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 703–714, 2015.

JIN, R. C. *et al.* The inhibition of the Anammox process: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 197, p. 67–79, 2012.

JOBARD, M *et al.* Microbial diversity in support of anaerobic biomass valorization. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8551, n. November, 2015.

KAFLE, G. K.; KIM, S. H.. Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for biogas production : Batch and continuous operation. **Applied Energy**, v. 103, p. 61–72, 2013.

KAFLE, G. K.; KIM, S. H.; SUNG, K.. Ensiling of fish industry waste for biogas production : A lab scale evaluation of biochemical methane potential ( BMP ) and kinetics. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 326–336, 2013.

KELLEHER, B P. Advances in poultry litter disposal technology – a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 27–36, 2002.

KIM, W. *et al.* Comparison of methanogenic community structure and anaerobic process performance treating swine wastewater between pilot and optimized lab scale bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 48–56, 2013.

KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production - A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1821–1830, 2014.

KOSTER, I. W.; LETTINGA, G. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. **Agricultural Wastes**, v. 9, n. 3, p. 205–216, 1984.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J.. Process characteristics , inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process , with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 491–500, 2014.

LE HYARIC, R. *et al.* Influence of moisture content on the specific methanogenic activity of dry mesophilic municipal solid waste digestate. **Journal of Chemical**

**Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 7, p. 1032–1035, 2012.

LI, C. *et al.* Assessment of regional biomass as co-substrate in the anaerobic digestion of chicken manure: Impact of co-digestion with chicken processing waste, seagrass and Miscanthus. **Biochemical Engineering Journal**, 2016.

LI, Y. *et al.* Comparison of methane production potential , biodegradability , and kinetics of different organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 565–569, 2013.

LIU, C. *et al.* Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 96–100, 2016.

LIU, Z. G. *et al.* Enhanced anaerobic treatment of CSTR-digested effluent from chicken manure: The effect of ammonia inhibition. **Waste Management**, v. 32, n. 1, p. 137–143, 2012.

MAO, C. *et al.* Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 2015.

MASSÉ, D. I.; RAJAGOPAL, R.; SINGH, G.. Technical and operational feasibility of psychrophilic anaerobic digestion biotechnology for processing ammonia-rich waste. **Applied Energy**, v. 120, p. 49–55, 2014.

MATA-ALVAREZ, J *et al.* A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 412–427, 2014.

MATA-ALVAREZ, S; LLABRÉS, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes . An overview of research achievements and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 3–16, 2000.

MAZOTTO, A. M. *et al.* Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 189–195, 2013.

MENARDO, S; AIROLDI, G; BALSARI, P. The effect of particle size and thermal pre-treatment on the methane yield of four agricultural by-products. **Bioresource**

**Technology**, v. 104, p. 708–714, 2012.

MENG, Y. *et al.* Enhancing anaerobic digestion performance of crude lipid in food waste by enzymatic pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 48–55, 2017.

MÉZES, L.; TAMÁS, J.. Feather Waste Recycling for Biogas Production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, p. 899–911, 2015.

MIAO, H. *et al.* Codigestion of Taihu blue algae with swine manure for biogas production. **Energy Conversion and Management**, v. 77, p. 643–649, 2014.

MU, Y.; WANG, G.; YU, H. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1302–1307, 2006.

MUTSCHLECHNER, M.; ILLMER, P.; WAGNER, A. O.. Biological pre-treatment: Enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*. **Waste Management**, v. 43, p. 98–107, 2015.

NESHAT, S. A. *et al.* Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 308–322, 2017.

NIE, H. *et al.* Mono-fermentation of chicken manure: Ammonia inhibition and recirculation of the digestate. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 238–246, 2015.

ONIFADE, A A *et al.* A Review : Potentials for biotechnological applications of keratin - degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feather sandother keratins as livestock f. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 1–11, 1998.

PALATSI, J *et al.* Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: Main process limitations and microbial community interactions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2219–2227, 2011.

PAPADOPOULOS, M. C. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. **Agricultural Wastes**, v. 14, n. 4, p. 275–290, 1985.

PATINVOH, R. J. *et al.* Innovative pretreatment strategies for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 13–24, 2017.

PATINVOH, R. J *et al.* Biological Pretreatment of Chicken Feather and Biogas Production from Total Broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1401–1415, 2016.

PATOWARY, D.; BARUAH, D C. Effect of combined chemical and thermal pretreatments on biogas production from lignocellulosic biomasses. **Industrial Crops & Products**, v. 124, n. January, p. 735–746, 2018.

PECES, M *et al.* Semi-aerobic fermentation as a novel pre-treatment to obtain VFA and increase methane yield from primary sludge. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 631–638, 2016..

PELLERA, F.; GIDARAKOS, E.. Chemical pretreatment of lignocellulosic agroindustrial waste for methane production. **Waste Management**, v. 71, p. 689–703, 2018.

RAFIQUE, R. *et al.* Effect of thermal , chemical and thermo-chemical pre-treatments to enhance methane production. **Energy**, v. 35, p. 4556–4561, 2010.

RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D. I.; SINGH, G.. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 632–641, 2013.

RAPOSO, F *et al.* Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode : An overview relating to methane yields and experimental procedures. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 861–877, 2011.

REN, Y. *et al.* A comprehensive review on food waste anaerobic digestion: Research updates and tendencies. **Bioresource Technology**, v. 247, n. July 2017, p. 1069–1076, 2018.

RESCH, C.*et al.* Enhancement options for the utilisation of nitrogen rich animal by-products in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2503–2510, 2011.

RICHARDS, F J. A flexible growth curve for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, v. 10, n. 2, p. 290–300, 1959.

RITTER, W F; CHIRNSIDE, A E M. Impact of Dead Bird Disposal Pits on Ground - Water Quality on the Delmarva Peninsula. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 105–111, 1995.

RODRIGUEZ, C. *et al.* Waste paper and macroalgae co-digestion effect on methane production. **Energy**, v. 154, p. 119–125, 2018.

SAKAR, S.; YETILMEZSOY, K.; KOCAK, E.. Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment - A literature review. **WM&R**, p. 3–18, 2009.

SALMINEN, E; EINOLA, J; RINTALA, J. The methane production of poultry slaughtering residues and effects of pre - treatments on the methane production of poultry feather. **Environmental Technology**, v. 24, p. 1079–1086, 2003a.

SALMINEN, E; EINOLA, J; RINTALA, J. The methane production of poultry slaughtering residues and effects of pre - treatments on the methane production of poultry feather. **Environmental Technology**, v. 24, p. 1079–1086, 2003b.

SALMINEN, E; RINTALA, J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 13–26, 2002.

SCHNUTE, J.. A Versatile Growth Model with Statistically Stable Parameters. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, n. 9, p. 1128–1140, 1981.

SHAH, F. A. *et al.* Co-digestion , pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 627–642, 2015.

SHANMUGAM, P; HORAN, N J. Simple and rapid methods to evaluate methane potential and biomass yield for a range of mixed solid wastes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 471–474, 2009.

SILVA, F. M S *et al.* Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste , sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339–349, 2018.

SILVESTRE, G; FERNÁNDEZ, B; BONMATÍ, A. Addition of crude glycerine as

strategy to balance the C / N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 377–385, 2015.

SONG, Z. *et al.* COMPARISON OF TWO CHEMICAL PRETREATMENTS OF RICE. **Bioresources**, v. 7, n. 3, p. 3223–3236, 2012.

STANNARD, C J; WILLIAMS, A P; GIBBS, P A. Temperature / growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. **Food Microbiology**, v. 2, n. 1985, p. 115–122, 1985.

TUMELERO, I. L. **Manejo de dejetos de suínos**, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2017. Disponível em <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>> Acesso em: 15 dezembro de 2018.

VALLADÃO, A B G; FREIRE, D M G; CAMMAROTA, M C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, p. 219–225, 2007.

VAVILIN, V A *et al.* Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material : An overview. **Waste Management**, v. 28, p. 939–951, 2008.

VENTURIN, B. *et al.* Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production purposes. **Bioresource Technology**, v. 266, n. June, p. 116–124, 2018.

WANG, B. *et al.* Determination of methane yield of cellulose using different experimental setups different experimental setups. **Water Science & Technology**, v. 70.4, n. August, 2014.

WANG, X. *et al.* Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 78–83, 2012.

WANG, Y. *et al.* Effects of co-digestion of cucumber residues to corn stover and pig manure ratio on methane production in solid state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 328–336, 2018.

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

WICKHAM, R. *et al.* Biomethane potential evaluation of co-digestion of sewage sludge and organic wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 3–8, 2016.

WU, JING; HU, Y.; Effects of thermal treatment on high solid anaerobic digestion of swine manure: Enhancement assessment and kinetic analysis. **Waste Management**, v. 62, p. 69–75, 2017.

XIA, Y. *et al.* Anaerobic digestibility of beef hooves with swine manure or slaughterhouse sludge. **Waste Management**, v. 38, p. 443–448, 2015.

XIA, Y.; *et al.* Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. **Waste Management**, v. 32, n. 3, p. 404–409, 2012a.

XIA, Y. *et al.* Identity and diversity of archaeal communities during anaerobic co-digestion of chicken feathers and other animal wastes. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 111–119, 2012b.

XIE, S.; WICKHAM, R.; NGHIEM, L. D. Synergistic effect from anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 191–197, 2017.

YANG, H. *et al.* A model for methane production in anaerobic digestion of swine wastewater. **Water Research**, v. 102, p. 464–474, 2016.

YANG, Y. *et al.* Enhanced anaerobic digestion of ammonia-rich swine manure by zero-valent iron: With special focus on the enhancement effect on hydrogenotrophic methanogenesis activity. **Bioresource Technology**, v. 270, n. August, p. 172–179, 2018.

YENIGÜN, O.; DEMIREL, B.. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5–6, p. 901–911, 2013.

YOON, Y. M. *et al.* Potential of anaerobic digestion for material recovery and energy production in waste biomass from a poultry slaughterhouse. **Waste Management**, v. 34, n. 1, p. 204–209, 2014.

YUAN, H.; ZHU, N.. Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 429–438, 2016.

ZAGHLOUL, T. I.; EMBABY, A. M.; ELMAHDY, A. R. Biodegradation of chicken feathers waste directed by *Bacillus subtilis* recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2387–2393, 2011.

ZAHAN, Z. *et al.* Semi-continuous anaerobic co-digestion of chicken litter with agricultural and food wastes: A case study on the effect of carbon/nitrogen ratio, substrates mixing ratio and organic loading. **Bioresource Technology**, v. 270, n. July, p. 245–254, 2018.

ZEEMAN, G *et al.* The Influence of the Total ' Ammonia Concentration on the Thermophilic Digestion of Cow Manure. **Agricultural Wastes**, v. 14, p. 19–35, 1985.

ZEYNALI, R.; KHOJASTEHPOUR, M.; EBRAHIMI-NIK, M.. Effect of ultrasonic pretreatment on biogas yield and specific energy in anaerobic digestion of fruit and vegetable wholesale market wastes. **Sustainable Environment Research**, v. 27, n. 6, p. 259–264, 2017.

ZHANG, D. *et al.* New Sludge Pretreatment Method to Improve Methane Production in Waste Activated Sludge Digestion. **Environmental Science Technology**, v. 44, n. 12, p. 4802–4808, 2010.

ZHANG, Q. *et al.* Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8899–8906, 2011.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D. J.. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. **Renewable Energy**, v. 98, p. 108–119, 2016.

ZHANG, W. *et al.* Batch anaerobic co-digestion of pig manure with dewatered sewage sludge under mesophilic conditions. **Applied Energy**, v. 128, p. 175–183, 2014.

ZWIETERING, M H *et al.* Modeling of the Bacterial Growth Curve Downloaded from. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.